

## Sposób otrzymywania wysokiej czystości miksoksantofili z ekstraktów barwnikowych cyjanobakterii

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania wysokiej czystości miksoksantofili z ekstraktów barwnikowych cyjanobakterii (sinic). Uzyskiwana frakcja miksoksantofili może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym.

### Stan techniki

Miksoksantofile są monocyklicznymi karotenoidami, pochodnymi miksolu ((2'S,3R)-3',4'-Didehydro-1',6'-seco-beta,beta-carotene-1',2',3-triol), glikozylowane przez 6-deoksy-D-glukozę, L-fuko- $\alpha$ -piranozę (fukozę), L-ramnozę, lub inne metylo-pentozy, występują w komórkach wielu gatunków sinic (cyjanobakterii) (Takaichi et al. 2001; Graham i Bryant 2009; Mohamed et al., 2004; Takaichi et al. 2005, 2006). Pomimo wczesnej identyfikacji - w latach trzydziestych XX w. (Heilbron i Lythgoe, 1936), zarówno właściwości fizyko-chemiczne jak i funkcja biologiczna tych związków nie zostały jak dotychczas poddane systematycznym badaniom.

Obecność w strukturze reszty cukrowej (pentoza lub rzadziej heksoza) przesądza o wysokim stopniu amfifilowości cząsteczki w porównaniu z innymi ksantofilami, wykazującymi przewagę właściwości hydrofobowych. Występowanie aglikonu terpenoidowego posiadającego sprzężony układ 11 wiązań podwójnych, podobnie do obecnego w innych ksantofilach, takich jak zeaksantyna bądź luteina, sugeruje wysoką reaktywność tych związków z aktywnymi formami tlenu (Sandmann, 2019). Badania prowadzone w ostatnich latach przez kilka niezależnych grup badawczych, wykazały niezbędność miksoksantofilu dla formowania prawidłowej struktury ścian komórkowych oraz właściwej organizacji strukturalnej błon tylakoidów, jak również jego zwiększoną akumulację w odpowiedzi na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe, takie jak silne światło, obniżona bądź podwyższona temperatura, destabilizacja błon fotosyntetycznych czy niedobór niektórych substancji mineralnych (Varkonyi et al. 2002; Mohammed i Vermaas, 2004, Mohammed et al. 2005; Schafer, 2005).

Wobec szerokiego zastosowania karotenoidów w branży spożywczej (barwniki pochodzenia naturalnego, suplementy diety), kosmetycznej (składniki kosmetyków o działaniu ochronnym/wspomagającym) oraz farmaceutycznej (substancje terapeutyczne), jak również rosnącego zapotrzebowania na nowe pochodne, można oczekiwać zwiększonego zainteresowania miksoksantofilami, a więc również sposobami ich otrzymywania.

W stanie techniki znane są metody otrzymywania czystych pochodnych barwników karotenoidowych na skalę preparatywną, które polegają na ich wstępnej ekstrakcji z materiału biologicznego przy pomocy rozpuszczalników organicznych (aceton, chloroform, metanol, etanol i inne, albo mieszaninami tych rozpuszczalników albo mieszaninami tych

rozpuszczalników z wodą). Uzyskane ekstrakty, zawierające zwykle mieszaninę wielu związków (chlorofile, karotenoidy, lipidy itp.) poddaje się następnie oczyszczaniu technikami chromatograficznymi, strąceniowymi i/lub podziałowymi, prowadzącymi do otrzymania czystych preparatów. W szczególności, metody chromatograficzne obejmują chromatografię na adsorbentach takich jak modyfikowane i zubożone żele krzemionkowe (Britton & Young, 1991).

W literaturze opisano dwustopniową metodę oczyszczania miksoksantofilu z ekstraktu barwnikowego cyjanobakterii *Synechocystis PCC6803*, gdzie stanowi on główny polarny karotenoid. Otrzymaną w wyniku ekstrakcji acetonem/metanolem w stosunku objętościowym 7:2 mieszaninę pigmentów nanoszono na kolumnę z żelem krzemionkowym 60 (Merck, Niemcy).  $\beta$ -karoten eluowano n-heksanem, a następnie chlorofil a oraz niepolarne karotenoidy eluowano n-heksanem/acetonem stosunku objętościowym 8:2 i 7:3. Frakcję zawierającą polarny karotenoid wymywano n-heksanem/acetonem stosunku objętościowym 1:1 i nanoszono na kolumnę DEAE-Toyopearl 650 M (Tosoh, Japonia), a miksoksantofil eluowano n-heksanem/acetonem stosunku objętościowym 1:1, pozostawiając chlorofil a i polarne lipidy związane na kolumnie (Takaichi et al., 2001).

Inną metodę dwustopniową zastosowano do oczyszczania miksoksantofilu z sinicy *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nagy et al., 2009; Nagy et al., 2018). Liofilizowane komórki poddawano ekstrakcji poprzez sonifikację w mieszaninie metanol:aceton, w stosunku objętościowym 3:1, a następnie po oddzieleniu fazy stałej rozpuszczalnik odparowywano. Frakcję zawierającą barwniki poddawano następnie separacji w dwufazowym układzie: heksan: metanol/woda stosunku objętościowym 85:15. Barwniki rozpuszczone w fazie polarnej były następnie poddawane oczyszczaniu na kolumnie zawierającej żel krzemionkowy (Kieselgel 60, o średnicy ziaren 0.063–0.200 mm, Merck) modyfikowany poprzez neutralizację wodorowęglanem sodu, przy zastosowaniu jako eluenta mieszanin heksan:aceton w różnych proporcjach.

Z opisu patentowego US4320050 znana jest metoda oczyszczania puli glikozylowanych karotenoidów (miksoksantofilu i oscillaksantyny) z liofilizowanej lub suszonej biomasy *Spirulina*, wykorzystanej uprzednio do ekstrakcji innych barwników (fikocyjanina, chlorofil). Metoda polega na ekstrakcji barwników karotenoidowych z biomasy przy pomocy acetonu, a następnie związaniu ich poprzez zmieszanie ekstraktu z proszkiem celulozowym (1 kg/4 L ekstraktu). Selektywne wydzielenie frakcji karotenoidów hydrofobowych oraz frakcji zawierającej karotenoidy glikozylowane uzyskuje się poprzez sekwencyjną desorpcję najpierw eterem naftowym, a następnie etanolem.

Z opisu patentowego WO0224183 znana jest metoda otrzymywania miksoksantofilu z komórek sinic opartą na poddaniu ich wstępnej ekstrakcji 50% roztworem wodnym acetonu podczas ucierania w moździerz z kulkami szklanymi, a następnie odwirowaniu części stałych.

Do otrzymanego ekstraktu dodawane są kolejno równe objętości acetonu, heksanu i wody z dodatkiem 10 g NaCl i całość poddawana jest następnie wstrząsaniu w rozdzielaczu. W wyniku rozdzielania faz miksoksantofil zbiera się w fazie heksanowej, którą poddaje się oddzieleniu, a następnie suszeniu na wyparce próżniowej w temperaturze 25°C przez 30 min. Czystość preparatu otrzymanego w wyniku zastosowania powyższej procedury szacowana jest na >90%. Opcjonalnie patent przewiduje doczyszczanie miksoksantofilu przez zastosowanie chromatografii odwróconej fazy.

Z opisu patentowego MD4360 znany jest strąceniowy proces otrzymywania miksoksantofili z sinicy *Arthrospira platensis*, polega na tym, że kilkakrotnie powtarza się ekstrakcję barwników z biomasy za pomocą roztworu wodno-etanolowego (70% - 96% etanol) z separacją biomasy przez wirowanie. Następnie do połączonych objętości ekstraktów dodaje się 40% wodorotlenek potasu, w stosunku objętościowym 3:1 do początkowej objętości biomasy poddanej ekstrakcji. Po upływie 4 - 6 godzin otrzymany roztwór miesza się z równą objętością heksanu. Następnie, po samorzutnej separacji faz i oddzieleniu frakcji etanolowej zawierającej miksoksantofile, frakcję tę należy rozcieńczyć wodą do stężenia alkoholu etylowego 45% - 50%, co powoduje wytrącenie barwników, a następnie odwirować przy 6000 rpm, a otrzymane kryształy przemywa się roztworem etanolu (45% - 50% ) i suszy.

Opisane powyżej metody otrzymywania frakcji miksoksantofili, charakteryzują się wieloetapowością procedury i wymagają zwykle kombinacji dwóch lub więcej technik podziałowych, strąceniowych i/lub chromatograficznych. Wieloetapowość metod otrzymywania miksoksantofili jest czasochłonna i generuje wysokie koszty. Dodatkowo, zależnie od użytych odczynników, frakcje miksoksantofili uzyskane technikami podziałowymi i strąceniowymi zawierać mogą znaczące domieszki innych metabolitów sinicowych (m.in. chlorofile, inne karotenoidy, lipidy), wykrywalne metodami chromatograficznymi i/lub spektroskopowymi.

Istota wynalazku

Nieoczekiwanie wyżej wymienione problemy udało się rozwiązać w przedmiotowym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania wysokiej czystości miksoksantofili z ekstraktów barwnikowych cyjanobakterii obejmujący:

- a) ekstrakcję rozpuszczalnikową biomasy z cyjanobakterii z wykorzystaniem sonifikacji,
- b) odwirowanie osadu z cyjanobakterii z etapu a) i dekantację nadsącza,
- c) otrzymanie ekstraktu poprzez odparowanie rozpuszczalnika lub mieszaniny rozpuszczalników z nadsącza uzyskanego w etapie b),
- d) rozpuszczenie ekstraktu otrzymanego w etapie c) w rozpuszczalniku lub mieszaninie rozpuszczalników,
- e) wprowadzenie roztworu ekstraktu z etapu d) na kolumnę chromatograficzną,

f) oczyszczanie rozpuszczonego ekstraktu na kolumnie chromatograficznej, przy czym etapy a) - f) prowadzi się w nieobecności światła, charakteryzujący się tym, że oczyszczanie na kolumnie chromatograficznej prowadzi się w warunkach izokratycznych z wykorzystaniem adsorbentu o charakterze polarnym, przy czym elucję w pierwszym etapie prowadzi się w stałym przepływie nie większym niż 5 ml/min do momentu całkowitego oddzielenia zaadsorbowanych na kolumnie miksoksantofili od pozostałych barwników, natomiast jako eluent stosuje się mieszaninę rozpuszczalników eter naftowy:aceton, korzystnie o stosunku objętościowym 6:4, zaś w drugim etapie prowadzi się elucję z wykorzystaniem rozpuszczalnika lub mieszaniny rozpuszczalników o wysokiej polarności do momentu całkowitego wymycia miksoksantofili z kolumny.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku ekstrakcję rozpuszczalnikową prowadzi się w rozpuszczalniku lub mieszaninie rozpuszczalników o wysokiej polarności.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku ekstrakcję rozpuszczalnikową prowadzi się w mieszaninie rozpuszczalników aceton:metanol, korzystnie o stosunku objętościowym 7:2, lub innym rozpuszczalniku lub mieszaninie rozpuszczalników o analogicznej polarności.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku etap ekstrakcji, odwirowania i dekantacji powtarza się do momentu, gdy po ponownym zawieszeniu osadu, ciecz ekstrahująca nie zmienia barwy.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku ekstrakt otrzymany po odparowaniu mieszaniny rozpuszczalników z nadsącza rozpuszcza się w mieszaninie rozpuszczalników eter naftowy:aceton o stosunku objętościowym 6:4.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku adsorbent o charakterze polarnym stanowi kwas (meta)krzemowy, niemodyfikowany żel krzemionkowy lub tlenek glinu.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku adsorbent o charakterze polarnym przed wprowadzeniem na kolumnę zawieszają się w mieszaninie rozpuszczalników eter naftowy:aceton o stosunku objętościowym 6:4.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku rozpuszczalnik lub mieszanina rozpuszczalników o wysokiej polarności stosowana w drugim etapie elucji stanowi metanol lub etanol lub rozpuszczalnik o analogicznej polarności.

W kontekście niniejszego wynalazku jako „adsorbent o charakterze polarnym” należy rozumieć substancję charakteryzującą się elektrycznym momentem dipolowym różnym od zera lub posiadającą grupy funkcyjne charakteryzujące się elektrycznym momentem dipolowym różnym od zera. Przykładowymi adsorbentami o charakterze polarnym są: kwas (meta)krzemowy, niemodyfikowany żel krzemionkowy lub tlenek glinu.

W kontekście niniejszego wynalazku jako „rozpuszczalnik o wysokiej polarności” należy rozumieć substancję inną niż woda, charakteryzującą się elektrycznym momentem dipolowym różnym od zera oraz wartością stałej dielektrycznej nie mniejszą niż 20, w

warunkach stanu standardowego (tj. ciśnieniu 1000 hPa i temperaturze 25°C). Przykładowymi rozpuszczalnikami o wysokiej polarności są: metanol, etanol lub ich dowolne mieszaniny.

W kontekście niniejszego wynalazku jako „warunki izokratyczne” należy rozumieć warunki elucji z kolumny, w których zapewniony jest niezmienny, stały skład fazy ruchomej, co skutkuje stabilnością oddziaływania pomiędzy fazą stacjonarną (adsorbent) i fazą ruchomą (eluent).

W kontekście niniejszego wynalazku jako „rozpuszczalnik o analogicznej polarności” należy rozumieć rozpuszczalniki inne niż etanol lub metanol lub ich mieszaniny charakteryzujące się stałą dielektryczną nie mniejszą niż 20, w warunkach stanu standardowego.

Dla lepszego zrozumienia istoty przedmiotowego wynalazku został on wyjaśniony w poniższych przykładach oraz załączonych figurach.

Na Fig. 1 zaprezentowano rozdział chromatograficzny ekstraktu barwników z komórek sinicy *Synechocystis* PCC 6803. na złożu zawierającym kwas (meta)krzemowy zrównoważony solwentem eter naftowy:aceton (6:4). (A) Początkowa faza rozdziału – widoczna separacja barwników z ekstraktu. (B) Faza końcowa rozdziału – miksoksantofile (glikozydy karotenoidów) widoczne na szczycie kolumny.

Na Fig.2 zaprezentowana została analiza frakcji miksoksantofilu *Synechocystis* PCC 6803. (A) Chromatogram HPLC/DAD przy długości fali 470 nm, zaznaczono czasy retencji poszczególnych substancji. (B) Widma absorpcyjne odpowiadające rozdzielanym substancjom.

Na Fig.3 zaprezentowana została analiza LC/MS frakcji miksoksantofilu *Synechocystis* PCC 6803. Chromatogram przy 450 nm (A), widmo masowe (ESI, jony dodatnie) dla pików o czasie retencji 5.56 min – miksoksantofil (B) oraz widmo fragmentacyjne (C) dla tej substancji.

Na Fig.4 zaprezentowana została analiza frakcji miksoksantofilu *Anabaena* 7120. (A) Chromatogram HPLC/DAD przy długości fali 470 nm, zaznaczono czasy retencji poszczególnych substancji. (B) Widma absorpcyjne odpowiadające rozdzielanym substancjom.

Na Fig. 5 zaprezentowana została analiza LC/MS frakcji miksoksantofilu *Anabaena* 7120. Chromatogram przy 450 nm (A) oraz widma masowe (ESI, jony dodatnie) pików o czasie retencji 10.32 min – ketomiksoksantofil (B) i 11.42 min - miksoksantofil (C).

Na Fig.6 zaprezentowana została analiza frakcji miksoksantofilu *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) (A) Chromatogram HPLC/DAD przy długości fali 470 nm, zaznaczono czasy retencji poszczególnych substancji. (B) Widma absorpcyjne odpowiadające rozdzielanym substancjom.

Na Fig. 7 zaprezentowana została analiza LC/MS frakcji glikozydów karotenoidowych *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) (A) Chromatogram przy 450 nm (A) oraz widma masowe (ESI,

jony dodatnie) pików o czasie retencji 7.22 min – hydromiksoksantofil (B) i 11.40 min - miksoksantofil (C).

Na Fig.8 zaprezentowana została analiza frakcji glikozydów karotenoidowych *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) izolowanej z preparatu handlowego (A) Chromatogram HPLC/DAD przy długości fali 470 nm, zaznaczono czasy retencji poszczególnych substancji. (B) Widmo absorpcyjne odpowiadające maksimum o czasie retencji 2.18 min. (C) Widmo absorpcyjne odpowiadające maksimum o czasie retencji 2.37 min.

### **Przykład 1 – Procedura ogólna otrzymywania miksoksantofili z ekstraktu cyjanobakterii (sinic)**

Wszystkie czynności przeprowadza się w ciemności, bądź z użyciem naczyń osłoniętych w taki sposób, by nie następował kontakt ich zawartości ze światłem.

Zebraną biomasę sinicową poddaje się sonifikacji w mieszaninie aceton:metanol w stosunku objętościowym 7:2 lub w 100% acetonie lub innym polarnym rozpuszczalniku organicznym (np. etanol, eter dimetylowy itp.). Osad komórkowy oddziela się od nadsącza poprzez wirowanie (5 min, min. 5000 rpm) i dekantację, po czym ponownie zawiesza się go w mieszaninie ekstrakcyjnej i wytrząsa energicznie. Ponownie przeprowadza się wirowanie i dekantację. Nadsącz za każdym razem jest zbierany. Procedurę powtarza się, aż do momentu, gdy po zawieszaniu osadu, ciecz nie zmienia barwy. Tak przygotowany ekstrakt barwników zagęszcza się przez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce obrotowej w temp. do 50°C lub przy pomocy strumienia gazu obojętnego (np. azotu). Po odparowaniu, barwniki rozpuszcza się ponownie w małej objętości mieszaniny eter naftowy (temp. wrzenia 40-60°C):aceton w stosunku objętościowym 6:4.

Do kolumny chromatograficznej (20 x 120 mm) należy wlać przygotowane uprzednio złożo - kwas (meta)krzemowy ( $H_2SiO_3$ , MM: 78,10) niemodyfikowany chemicznie lub inny adsorbent o podobnych właściwościach fizykochemicznych (niemodyfikowany żel krzemionkowy lub tlenek glinu), zawieszony w mieszaninie eter naftowy:aceton w stosunku objętościowym 6:4. Po ustabilizowaniu złoża kolumnę należy podłączyć do pompy próżniowej poprzez kolbę filtracyjną. Następnie na kolumnę wprowadza się uprzednio przygotowany ekstrakt barwników. Poprzez uruchomienie pompy należy wytworzyć podciśnienie wystarczające do wytworzenia przepływu rzędu 5 ml/min. Rozdział prowadzi się izokratycznie, przy stałym przepływie, uzupełniając w miarę potrzeby eluent (eter naftowy:aceton w stosunku objętościowym 6:4) nad złożem kolumny. Eluent może stanowić inny rozpuszczalnik organiczny bądź mieszanina rozpuszczalników wykazującą się stałą dielektryczną rzędu 9.5. Rozdział barwników następuje zgodnie ze wzrastającą polarnością - najpierw kolumnę opuszczają substancje najmniej polarne, w tym karoteny, chlorofile oraz ksantofile inne niż miksoksantofil. Miksoksantofil(e) można zaobserwować na kolumnie jako wyraźne pomarańczowy pas u szczytu kolumny, który migruje bardzo wolno w porównaniu do

pozostałych barwników. Początkową i końcową fazę rozdziału, z frakcją glikozydów karotenoidowych związaną na złożu adsorbenta ilustruje Fig. 1. Po usunięciu innych barwników, gdy na kolumnie pozostanie jedynie frakcja miksoksantofili, należy wymienić kolbę filtracyjną, a następnie kontynuować elucję przy pomocy czystego metanolu (lub innego polarnego rozpuszczalnika o zbliżonych właściwościach fizykochemicznych np. etanol), który umożliwi elucję miksoksantofili z kolumny. Elucję należy prowadzić do momentu całkowitego odbarwienia złoża. Zebrany w kolbie filtracyjnej roztwór miksoksantofili należy zagęścić przez odparowanie lub przedmuchiwanie gazem obojętnym (azot) w taki sam sposób, jak ekstrakt barwników przed rozdziałem chromatograficznym.

### **Przykład 2 – Otrzymywanie miksoksantofilu z jednokomórkowej sinicy *Synechocystis* PCC6803**

*Synechocystis* sp. PCC 6803 (szczep pozyskany z Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria (Instytut Pasteur)) hodowano fotoautotroficznie w płynnej pożywce BG11 (Rippka et al., 1979) z dodatkiem 5 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), w temperaturze 23°C, przy stałym oświetleniu o mocy strumienia 60  $\mu\text{mol}$  fotonów  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , z wykorzystaniem lamp fluorescencyjnych (Philips TL-D 18 W/33–640). Hodowle zawiesinowe (200 ml w kolbach Erlenmayera o objętości całkowitej 500 ml) były wytrząsane na wytrząsarce rotacyjnej z prędkością 150 rpm. Wzrost hodowli monitorowano przez pomiar gęstości optycznej  $\text{OD}_{750}$  na spektrofotometrze Jasco-V650.

Komórki z hodowli o całkowitej objętości 3 L, w fazie stacjonarnej (zwykle 21 dni od inokulacji,  $\text{OD}_{750}$  = 0.5-0.8) były zbierane przez wirowanie (7000 rpm, 5 min). Supernatant odrzucano, a osad komórkowy poddawano sonifikacji (10 min, 70% mocy; Sonix, Vibracell VCX 750) w ok. 200 ml mieszaniny ekstrakcyjnej aceton:metanol o stosunku objętościowym 7:2 dodawanej w 3 porcjach o równej objętości, a następnie zagęszczano poprzez odparowanie przy użyciu wyparki próżniowej w temperaturze pokojowej w ciemności.

Osuszoną mieszaninę barwników rozpuszczano w mieszaninie rozpuszczalników do chromatografii adsorpcyjnej o składzie eter naftowy:aceton w stosunku objętościowym 6:4 i poddawano rozdziałowi na kolumnie o objętości złoża 300 mL, zawierającej kwas (meta)krzemowy zrównoważony tą mieszaniną rozpuszczalników, w sposób przedstawiony w Przykładzie 1. Kolumnę eluowano 500 ml metanolu po zakończeniu rozdziału.

Otrzymany roztwór miksoksantofilu zagęszczano przez odparowanie na wyparce próżniowej i poddawano suszeniu w temperaturze pokojowej w ciemności.

Skład otrzymanej frakcji analizowano metodą HPLC/DAD przy użyciu chromatografu Jasco PU-4180 z detektorem z matrycą fotodiod Jasco MD-410 i kolumną Zorbax SB-C18 (wymiary: 4,6 mm x 150 mm, porowatość: 3,5  $\mu\text{m}$ ) (Agilent Technologies). Frakcję rozpuszczano bezpośrednio w fazie ruchomej o składzie acetonitryl:metanol:woda o stosunku

objętościowym 72:8:1 (Gillmore i Yamamoto, 1991). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono jak opisano w (Myśliwa-Kurdziel i in., 2012) szybkość przepływu: 0,7 ml/min rosnąca do 1,4 ml/min w pierwszych 16,5 min; objętość próbki 110  $\mu$ l i długość fali detekcji 470 nm.

Na chromatogramie HPLC/DAD (Fig. 2A) zidentyfikowano jedno główne maksimum (czas retencji 7,11 min; 67,83% całkowitej powierzchni pod pikami) i 3 maksima o mniejszej intensywności (czasy retencji 8,26 8,70 i 8,90 min; odpowiednio 3,37%, 12,66%, 16,15% całkowitej powierzchni pod pikami). Widma absorpcyjne rozdzielonych związków przedstawiono na Fig. 2B. Wykazują one znaczne podobieństwo w zakresie UV/Vis. W szczególności, substancja 1, o czasie retencji RT=7,11 min posiada maksima absorpcji ( $\lambda$ )<sub>max</sub> = 366, 452, 476, 506 nm; substancja 2, o czasie retencji RT=8,27 min, ( $\lambda$ )<sub>max</sub> = 366, 448, 472, 504 nm; substancja 3, o czasie retencji RT=8,70 min, ( $\lambda$ )<sub>max</sub> = 366, 446, 470, 502; substancja 4, o czasie retencji RT=8,90 nm; ( $\lambda$ )<sub>max</sub> = 364, 446, 470, 500). Przedstawione widma absorpcyjne odpowiadają znanym z literatury przedmiotu widmom absorpcyjnym miksoksantofilu (Takaichi et al, 2001). Obserwowane różnice, odpowiadać mogą formom izomerycznym związku, w szczególności trans-miksoksantofilowi (substancja 1) oraz cis-miksoksantofilom (substancje 2-4), charakteryzującym się zaznaczoną absorpcją w zakresie UV (Melendez-Martinez et al, 2013).

W celu dalszej identyfikacji tożsamości wydzielonych związków przeprowadzono analizę LC/MS techniką ESI (Fig. 3A-C). Analiza ta umożliwiła potwierdzenie obecności w badanej frakcji 4 substancji (Fig. 3A) o widmie masowym jonów dodatnich odpowiadającym miksoksantofilowi (Fig. 3B), charakteryzującym się masą cząsteczkową 758 u oraz stosunkiem masy do ładunku dla jonu macierzystego m/z=758 (Fig. 3C).. Analiza ta potwierdza, że w otrzymanej frakcji występują 4 formy izomeryczne miksoksantofilu. W przypadku substancji charakteryzowanych czasami retencji 6.01; 6.30; 6.48 min podano jedynie wartość m/z jonu głównego. Wartości m/z dla pozostałych jonów tych substancji są identyczne z dokładnością do drugiego miejsca po przecinku jak te wykazane dla substancji z RT=5.56 min. Analizowana frakcja charakteryzuje się wysokim stopniem czystości i homogenności, z uwagi na fakt, iż sumaryczna powierzchnia pików miksoksantofili pokrywa 91% całkowitej powierzchni pod chromatogramem oraz brak jest innych substancji towarzyszących.

Zestawienie wartości m/z obserwowane dla jonów zidentyfikowanych substancji przedstawiono w Tabeli 1a.

Wartości m/z obserwowanych dla jonów fragmentacyjnych zidentyfikowanych substancji zestawiono w Tabeli 1b. Pozwalają one jednoznacznie zidentyfikować wszystkie składniki wyosobnionej frakcji jako miksoksantofil.

**Tabela 1a** - Zestawienie czasów retencji związków obecnych we frakcji miksoksantofilu ze *Synechocystis* na podstawie chromatogramu wraz z odpowiadającymi im m/z wybranych jonów wyznaczonych metodą spektrometrii mas wraz z identyfikacją związków.

Czas retencji [min]	Zidentyfikowany związek	Jony [m/z]					
5.56	Miksoksantofil (dimetylofukozyd)	758.47	781.50	1541.02	843.54	567.42	549.41
6.01	Miksoksantofil (dimetylofukozyd)	758.51					
6.30	Miksoksantofil (dimetylofukozyd)	758.48					
6.48	Miksoksantofil (dimetylofukozyd)	758.45					

**Tabela 1b** - Zestawienie jonów fragmentacyjnych dla jonu o m/z = 781 (główny pik) dla każdego z wykrytych związków

Czas retencji [min]	Jony fragmentacyjne dla jonu o stosunku masy do ładunku 781 [m/z]					
5.56	700.46	608.41	525.36	433.31	209.13	145.1
6.01	700.46	608.39	525.36	433.3		145.1
6.30	700.49	608.42	525.37	433.31		145.1
6.48	700.5	608.38	525.36	433.3	209.12	145.09

Stężenie miksoksantofilu oceniano ilościowo wykorzystując współczynnik absorpcji molowej  $\epsilon = 1253$ , przy długości fali 440 nm. Zwykle, w zależności od konkretnych warunków hodowli, z 3 L kultury *Synechocystis* o gęstości optycznej OD<sub>750</sub> co najmniej 0.5 otrzymuje się ok. 200 mikrogramów miksoksantofilu o czystości 91 %.

### Przykład 3 – Otrzymywanie miksoksantofilu z kolonijnej sinicy *Anabaena* 7120

*Anabaena* PCC 7120 (szczep UTEX 2576 pozyskany z kolekcji UTEX należącej do University of Texas, Austin, dostępny również jako *Nostoc* sp. (ATCC® 27893™)) była

hodowana fotoautotroficznie w płynnej pożywce BG11 (-N) (Rippka et al., 1979) z dodatkiem 5mM HEPES-NaOH (pH 7.5), w temperaturze 23°C, przy stałym oświetleniu o mocy strumienia 60  $\mu\text{mol}$  fotonów  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , z wykorzystaniem lamp fluorescencyjnych (Philips TL-D 18 W/33–640). Hodowle zawieszinowe (200 ml w kolbach Erlenmayera o objętości całkowitej 500 ml) były wytrząsane na wytrząsarce rotacyjnej z prędkością 150 rpm. Wzrost hodowli monitorowano przez pomiar gęstości optycznej  $\text{OD}_{750}$  na spektrofotometrze Jasco-V650.

Komórki z hodowli o całkowitej objętości 3 L, w fazie stacjonarnej (zwykle 21 dni od inokulacji,  $\text{OD}_{750}=0.5-0.8$ ) były zbierane przez wirowanie (7000 rpm, 5 min). Supernatant odrzucano, a osad komórkowy poddawano sonifikacji (10 min, 70% mocy; Sonix, Vibracell VCX 750) w ok. 200 ml mieszaniny ekstrakcyjnej aceton:metanol o stosunku objętościowym 7:2 dodawanej w 3 porcjach o równej objętości, a następnie zagęszczano poprzez odparowanie przy użyciu wyparki próżniowej w temperaturze pokojowej w ciemności.

Osuszoną mieszaninę barwników rozpuszczano w mieszaninie rozpuszczalników do chromatografii adsorpcyjnej o składzie eter naftowy:aceton o stosunku objętościowym 6:4 i poddawano rozdzielaniu na kolumnie o objętości złoża 300 mL, zawierającej kwas (meta)krzemowy zrównoważony tą mieszaniną rozpuszczalników, w sposób przedstawiony w Przykładzie 1. Kolumnę eluowano 500 ml metanolu po zakończeniu rozdzielania.

Otrzymany roztwór miksoksantofilu zagęszczano przez odparowanie na wyparce próżniowej i poddawano suszeniu w temperaturze pokojowej w ciemności.

Skład otrzymanej frakcji analizowano metodą HPLC/DAD, a następnie LC/MS jak opisano w Przykładzie 2.

Na chromatogramie HPLC/DAD (Fig. 4A) zidentyfikowano jedno główne maksimum (czas retencji 5,05 min; 62,43% całkowitej powierzchni pod pikami) i 4 maksima o mniejszej intensywności (czasy retencji 1,58, 5,71, 6,22 i 7,12 min; odpowiednio 2,67%, 13,24%, 12,75% i 3,50% całkowitej powierzchni pod pikami). Widma absorpcyjne rozdzielonych związków przedstawiono na (Fig. 4B). Wykazują one znaczne podobieństwo w zakresie UV/Vis. W szczególności, substancja 1, o czasie retencji  $\text{RT}=5,05$  min posiada maksima absorpcji ( $\lambda$ ) $_{\text{max}} = 480$  nm; substancja 2, o czasie retencji  $\text{RT}=1,58$  min, ( $\lambda$ ) $_{\text{max}} = 450$  nm; substancja 3, o czasie retencji  $\text{RT}=5,71$  min, ( $\lambda$ ) $_{\text{max}} = 476$  nm; substancja 4, o czasie retencji  $\text{RT}=6,22$  min, ( $\lambda$ ) $_{\text{max}} = 475$  nm; substancja 5, o czasie retencji  $\text{RT}=7,12$  min ( $\lambda$ ) $_{\text{max}} = 470$  nm. Uzyskane widma absorpcyjne odpowiadają znanym z literatury przedmiotu widmom absorpcyjnym keto-miksoksantofilu i miksoksantofilu. Substancje charakteryzujące się czasami retencji 6,22 i 7,12 min odpowiadać mogą formom izomerycznym (cis-miksoksantofilom).

W celu dalszej identyfikacji tożsamości wydzielonych związków przeprowadzono analizę LC/MS techniką ESI (Fig. 5A). Analiza ta umożliwiła potwierdzenie obecności w badanej frakcji łącznie 9 substancji, w tym 4 substancji o widmie masowym jonów dodatnich odpowiadającym ketomiksoksantofilowi i 3 substancji odpowiadającym miksoksantofilowi (Fig.

5B,C), charakteryzujących się masą cząsteczkową odpowiednio 744 i 730 oraz stosunkiem masy do ładunku dla jonu macierzystego  $m/z=744$  i  $730$ . Analiza ta potwierdza, że w otrzymanej frakcji występują co najmniej 4 formy izomeryczne ketomiksoksantofilu i 3 izomery miksoksantofilu. Analizowana frakcja charakteryzuje się wysokim stopniem czystości i homogenności, z uwagi na fakt, iż sumaryczna powierzchnia pików miksoksantofilu pokrywa 98% całkowitej powierzchni pod chromatogramem oraz brak jest innych substancji towarzyszących.

Zestawienie najważniejszych parametrów charakteryzujących zidentyfikowane substancje przedstawiono w Tabeli 2.

**Tabela 2** – Zestawienie czasów retencji związków obecnych we frakcji miksoksantofilu z *Anabaena* 7120 na podstawie chromatogramu wraz z odpowiadającymi im wybranymi jonami oznaczonymi metodą spektrometrii mas wraz z identyfikacją związku.

Czas retencji [min]	Zident. związek	Jony [m/z]						% zawartości
10.32	4-keto miksoksantofil	744.46	581.4	563.39	523.35			54.8
11.42	Miksoksantofil	730.48	583.41	567.42	549.41			14.56
13.03	4-keto miksoksantofil	744.46	730.48	581.4	563.29	539.39	313.27	0.78
14.59	4-keto miksoksantofil	744.46	730.48	581.4	563.29	539.39	313.29	0.94
14.85	4-keto miksoksantofil	744.46	581.4	563.39	523.35			1.68
15.20	4-keto miksoksantofil	744.46	581.4	563.39	523.35			9.25
15.35	4-keto miksoksantofil	744.46	581.4	563.39	523.35			9.42
16.06	Miksoksantofil	730.48	-	567.42	539.29		313.27	1.55
16.61	Miksoksantofil	730.48	-	567.42	549.41			7.01

Zwykle, w zależności od konkretnych warunków hodowli, z 3 L kultury o gęstości optycznej  $OD_{750}$  co najmniej 0.5 otrzymuje się ok. 300 mikrogramów miksoksantofilu, o czystości co najmniej 95%.

#### **Przykład 4 – Otrzymywanie frakcji glikozydów karotenoidowych z nietoksycznej sinicy *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) zawierającej miksoksantofile**

Cyjanobakteria *Arthrospira platensis* (szczep SAG 85.79 dostępny w kolekcji Uniwersytetu w Getyndze) (szczep ten anotowany jest także w UTEX (UTEX 2340) jako „*Spirulina platensis*”, ekwiwalentny szczep *Arthrospira platensis* (Nordstedt) Gomont (ATCC® 29408™) jest sinicą, w której składzie karotenoidowym występują 2 typy związków glikozydowych: miksoksantofil i oscylaksantyna (1,1'-dihydroxy-2,2'-di- $\beta$ -l-rhamnosyl-1,2,1',2'-tetrahydro-3,4,3',4'-tetrahydrolycopene) (Hertzberg i Liaaen-Jensen, 1969).

*A. platensis* była hodowana fotoautotroficznie w płynnej pożywce według Zarrouk (Vonshak, 1997), z dodatkiem NaOH (końcowe pH >9.0), w temperaturze 22°C, przy oświetleniu o mocy strumienia 70  $\mu\text{mol}$  fotonów  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  i fotoperiodzie 16/8h, z wykorzystaniem lamp fluorescencyjnych (Philips TL-D 18 W/33–640). Hodowle zawieszinowe (3000 ml w kolbach Erlenmayera o objętości całkowitej 5000 ml) były mieszane co najmniej 1 raz na 48h. Wzrost hodowli monitorowano przez pomiar gęstości optycznej  $OD_{750}$  na spektrofotometrze Jasco-V650.

Komórki z hodowli o całkowitej objętości 3 L, w fazie stacjonarnej (zwykle 21 dni od inokulacji,  $OD_{750}=0,5-0,8$ ) były zbierane przez wirowanie (7000 rpm, 5 min). Supernatant odrzucano, a osad komórkowy poddawano się sonifikacji (10 min, 70% mocy; Sonix, Vibracell VCX 750) w ok. 200 ml mieszaniny ekstrakcyjnej aceton:metanol o stosunku objętościowym 7:2 dodawanej w 3 porcjach o równej objętości, a następnie zagęszczany poprzez odparowanie przy użyciu wyparki próżniowej w temperaturze pokojowej w ciemności.

Osuszoną mieszaninę barwników rozpuszczano w mieszaninie rozpuszczalników do chromatografii adsorpcyjnej o składzie eter naftowy:aceton o stosunku objętościowym 6:4 i poddawano rozdzielaniu na kolumnie o objętości złoża 300 mL, zawierającej kwas (meta)krzemowy zrównoważony tą mieszaniną rozpuszczalników, w sposób przedstawiony w Przykładzie 1. Kolumnę eluowano 500 ml metanolu po zakończeniu rozdzielania.

Otrzymany roztwór miksoksantofilu zagęszczano przez odparowanie na wyparce próżniowej i poddawano suszeniu w temperaturze pokojowej w ciemności.

Skład otrzymanej frakcji analizowano metodą HPLC/DAD przy użyciu chromatografu Jasco PU-4180 z detektorem z matrycą fotodiod Jasco MD-410 i kolumną Zorbax SB-C18 (wymiary: 4,6 mm x 150 mm, porowatość: 3,5  $\mu\text{m}$ ) (Agilent Technologies). Frakcję rozpuszczano bezpośrednio w fazie ruchomej o składzie acetonitryl:metanol:woda o stosunku objętościowym 72:8:1 (Gillmore i Yamamoto, 1991). Rozdział chromatograficzny

przeprowadzono jak opisano (Myśliwa-Kurdziel i in., 2012) szybkość przepływu: 0,7 ml/min rosnąca do 1,4 ml/min w pierwszych 16,5 min; objętość próbki 110  $\mu$ l i długość fali detekcji 470 nm.

Na chromatogramie HPLC/DAD (Fig. 6A) zidentyfikowano jedno główne maksimum (czas retencji 5,76 min; 50,74% całkowitej powierzchni pod pikami) i 3 maksima o mniejszej intensywności (czasy retencji 3,45, 4,66 i 5,27 min; odpowiednio 9,47%, 19,04%, 4,81% całkowitej powierzchni pod pikami). Widma absorpcyjne rozdzielonych związków przedstawiono na (Fig. 6B). Wykazują one wyraźnie zaznaczone różnice tak położenia maksimów jak i struktury widma w zakresie UV/Vis. W szczególności, substancja 1, o czasie retencji RT=5,76 min posiada maksima absorpcji ( $\lambda$ )<sub>max</sub> = 474 nm. Widmo absorpcyjne tej substancji odpowiada znanym z literatury przedmiotu widmom absorpcyjnym keto-miksoksantofilu i miksoksantofilu. Substancja 2, o czasie retencji RT=3,45 min, posiada maksima absorpcji ( $\lambda$ )<sub>max</sub> = 414 nm; oraz substancja 3, o czasie retencji RT=4,66 min, ( $\lambda$ )<sub>max</sub> = 416 nm. Widma absorpcyjne tych substancji odpowiadać mogą pochodnym karotenoidów o właściwościach hydrofilowych (np. oscylaksantynie). Maksimum 4, o czasie retencji RT=5,27 min, charakteryzuje się brakiem wyraźnej struktury widma i odpowiada prawdopodobnie nierozdzielonej mieszaninie substancji.

W celu dalszej identyfikacji tożsamości wydzielonych związków przeprowadzono analizę HPLC/MS techniką ESI (Fig. 7A). Analiza ta potwierdziła obecność w badanej frakcji łącznie 17 substancji, w tym 1 substancji o widmie masowym jonów dodatnich odpowiadającym hydromiksoksantofilowi i 4 substancji odpowiadającym miksoksantofilowi (Fig. 7B,C) oraz 3 substancji odpowiadającym oscylaksantynie, charakteryzujących się masą cząsteczkową odpowiednio 730, 746 i 893 oraz stosunkiem masy do ładunku dla jonu macierzystego m/z= 730, 746 i 893. Analiza ta potwierdza, że w otrzymanej frakcji występują co najmniej 3 formy izomeryczne miksoksantofilu (włączając hydromiksoksantofil) i co najmniej 2 formy oscylaksantyny. Występuje również zauważalny udział nierozdzielonej mieszaniny stanowiącej przypuszczalnie zagregowane i/lub zjonizowane formy glikozydów karotenoidowych (widoczne na chromatogramie, Fig. 6A) oraz obecność kwasu oleinowego, stanowiącego zanieczyszczenie (na poziomie ok. 5%). Stwierdzona obecność deoksymetylopentozy wskazuje, iż obecne w mniejszych ilościach pozostałe składniki frakcji stanowić mogą produkty rozpadu glikozylowanych karotenoidów, w tym głównie oscylaksantyny (Aakermann et al., 1992).

Zestawienie najważniejszych parametrów charakteryzujących zidentyfikowane substancje zostały przedstawione w Tabeli 3.

**Tabela 3** – Zestawienie czasów retencji związków obecnych we frakcji miksoksantofilu z *Arthrospira platensis* na podstawie chromatogramu wraz z odpowiadającymi im wybranymi jonami oznaczonymi metodą spektrometrii mas wraz z identyfikacją związku.

Czas retencji [min]	Zident. związek	Jony [m/z]								% zawartości
5.9		532.38	663.44	576.38	515.36	316.23				1.43
7.22	Hydroksy miksoksantofil	746.47	658.47							26.28
7.57	Miksoksantofil – produkt degradacji	313.28	515.32	475.33	331.28					0.44
8.42	Miksoksantofil – produkt degradacji	313.27	147.93	366.26	515.32	326.43	570.46	614.48	658.51	6.08
9.11	Oscylaksantyna	440.41	326.38	147.93	149.93	483.36	512.42	526.43	570.46	0.79
9.52		147.93	149.93	319.28	392.27	570.46	575.51	744.46	746.48	2.93
10.58		280.26	149.93	263.34	730.54	746.47	763.48			2.89
11.4	Miksoksantofil	730.48	672.44	567.42						28.29
11.65	Nierozdzielona mieszanina	730.48	746.48	575.50	395.39	294.28	149.93	139.99		2.12
12.8	Kwas oleinowy	282.28	637.31	265.25	247.24					3.27
13.2	Kwas oleinowy	282.28	625.27	481.31	381.30	265.25	247.24			2.00
14.06	Miksoksantofil	382.44	730.48	685.17	575.50	394.33	294.28	284.30	149.93	1.51
14.36		593.28	758.56	575.90						1.36
15		474.31	593.28	418.25	362.19	250.06	147.93			0.87
15.58	Miksoksantofil	284.30	730.49	575.51	564.45	474.32	279.09	147.93		9.33
16.25	Miksoksantofil	730.48	673.44	639.27	575.50	546.48				8.64
16.61	Deoksymetylo pentoza	149.93	147.93	310.31	474.31	575.51	700.55	730.48	744.59	1.77

Zwykle, w zależności od konkretnych warunków hodowli, z 3 L kultury o gęstości optycznej OD<sub>750</sub> co najmniej 0.5-0.8 otrzymuje się ok. 800 mikrogramów frakcji glikozylowanych karotenoidów o czystości ok. >80%. Poza glikozydami karotenoidowymi, jedyną substancją

organiczną pochodzenia biologicznego, identyfikowalną przy pomocy spektrometrii mas, jest kwas oleinowy.

### **Przykład 5 – Otrzymywanie miksoksanofilu z suchej masy (preparat handlowy) *Arthrospira platensis* (Spirulina)**

1 g suchej masy *Arthrospira platensis* (preparat dostępny handlowo - tabletki) Witpak Spirulina Tabletki 250 g; suplement diety; kraj pochodzenia: Chiny, producent WITPAK sp. z o.o. sp. K. ul. Chałubińskiego 13, 25-619 Kielce; numer partii: 061119-1 ekstrahowano 250 ml w mieszaninie ekstrakcyjnej aceton:metanol o stosunku objętościowym 7:2, a następnie zagęszczano poprzez odparowanie przy użyciu wyparki próżniowej w temperaturze pokojowej w ciemności.

Osuszoną mieszaninę barwników rozpuszczano w mieszaninie rozpuszczalników do chromatografii adsorpcyjnej o składzie eter naftowy:aceton o stosunku objętościowym 6:4 i poddawano rozdzielaniu na kolumnie o objętości złoża 300 mL, zawierającej kwas (meta)krzemowy zrównoważony tą mieszaniną rozpuszczalników, w sposób przedstawiony w Przykładzie 1. Kolumnę eluowano 500 ml metanolu po zakończeniu rozdzielania.

Otrzymany roztwór miksoksanofilu zagęszczano przez odparowanie na wyparce próżniowej i poddawano suszeniu w temperaturze pokojowej w ciemności.

Skład otrzymanej frakcji analizowano metodą HPLC/DAD przy użyciu chromatografu Jasco PU-4180 z detektorem z matrycą fotodiod Jasco MD-410 i kolumną Zorbax SB-C18 (wymiary: 4,6 mm x 150 mm, porowatość: 3,5 µm) (Agilent Technologies). Frakcję rozpuszczano bezpośrednio w fazie ruchomej o składzie acetonitryl:metanol:woda o stosunku objętościowym 72:8:1 (Gillmore i Yamamoto, 1991). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono jak opisano (Myśliwa-Kurdziel i in., 2012) szybkość przepływu: 0,7 ml/min rosnąca do 1,4 ml/min w pierwszych 16,5 min; objętość próbki 110 µl i długość fali detekcji 470 nm.

Na chromatogramie HPLC/DAD (Fig. 8A) zidentyfikowano jedno główne maksimum (czas retencji 2,18 min) oraz drugie maksimum charakteryzujące się czasem retencji 2,37 min. Struktura widma absorpcji maksimum głównego (Fig. 8B), w szczególności występowanie wielu maksimów charakterystycznych dla izomerów miksoksanofilu i/lub oscylaksantyny jak również podwyższony poziom tła i względnie krótki czas retencji, sugerują, że różne formy tych związków nie ulegają separacji w warunkach rozdzielania chromatograficznego, stanowiąc prawdopodobnie wielocząsteczkowe agregaty. Całkowity brak struktury widma absorpcji drugiego maksimum (czas retencji 2,37 min) wskazuje na zagregowany materiał o niskich masach cząsteczkowych (Fig. 8C), który stanowi zanieczyszczenie frakcji glikozylowanych karotenoidów.

Wynik ten pokazuje, że procesy technologiczne, którym poddawana jest biomasa, w tym wielostopniowe odwadnianie mechaniczne oraz suszenie rozpyłowe w podwyższonej temperaturze, ma istotny wpływ na czystość i jakość glikozydów karotenoidowych otrzymywanych proponowaną metodą. Obserwowane zanieczyszczenie może pochodzić również od dodatkowych, nieznanych domieszek dodawanych do biomasy *Atrhrospira platensis* w procesie przygotowywania preparatu handlowego np. substancje konserwujące, przeciwzbrylające, vehiculum farmaceutyczne itp.

Otrzymany roztwór miksoksantofilu zagęszczano przez odparowanie na wyparce próżniowej i poddawano suszeniu w temperaturze pokojowej w ciemności.

Zwykle z 1 g preparatu handlowego otrzymuje się ok. 15 mg frakcji glikozylowanych karotenoidów. Frakcja posiada szacunkowo czystość na poziomie >50%, przy jednoczesnej nieobecności innych substancji organicznych pochodzenia biologicznego, identyfikowalnych przy pomocy spektrometrii mas.