



УКРАЇНА

(19) UA (11) 24468 (13) U

(51) МПК (2006)

C12N 1/12

C11B 1/10 (2007.01)

C12R 1/89 (2007.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЕКСТРАКЦІЇ ЛІПІДІВ І ПІГМЕНТІВ З ОДНОКЛІТИННИХ ВОДОРОСТЕЙ

1

(21) 20040604661

(22) 14.06.2004

(24) 10.07.2007

(46) 10.07.2007, Бюл. № 10, 2007 р.

(72) Басова Марина Михайлівна

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ПІВДЕННИХ МОРІВ ІМ.
О.О. КОВАЛЕВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕ-
МІЇ НАУК УКРАЇНИ(57) 1. Спосіб екстракції ліпідів і пігментів з одно-
клітинних водоростей, що включає обробку попе-
редньо розтертих із кварцовим піском сухих одно-
клітинних водоростей сумішшю для екстракції й
фільтрацію отриманого екстракту, а також руйну-

2

вання пігментів й очищення екстракту від неліпід-
них домішок розчином NaCl, який **відрізняється**
тим, що водорості з'єднують із сумішшю для екст-
ракції в співвідношенні 1:1 (мг/мл), у профільтро-
ваний ліпід-пігментний комплекс для руйнування
пігментів додають порціями концентровану соляну
кислоту (HCl) до досягнення екстрактом со-
лом'яного кольору, а для очищення екстракту від
неліпідних домішок додають 1-3 мл 5 % NaCl.

2. Спосіб екстракції ліпідів і пігментів з одноклітин-
них водоростей за п. 1, який **відрізняється** тим,
що як суміш для екстракції використовують суміш
гексан:ізопропіловий спирт 2:1.

Передбачувана корисна модель відноситься
до прикладної гідробіології й альгології і може бути
використана для оцінки ролі ліпідів у метаболізмі
мікроводоростей у природному середовищі і при
культивуванні.

Одним з найважливіших компонентів живої ор-
ганічної речовини є ліпіди, які в значній мірі визна-
чають структурно-функціональні особливості й
енергетичний потенціал, як клітини, так і організму
в цілому. У складі ліпідів можна виділити велику
групу речовин - поліненасичені жирні кислоти, що
синтезуються тільки мікроводоростями і є вкрай
необхідними для людини і тварин. Винятково важ-
лива біологічна роль синтезованих мікроводорос-
тями поліненасичених жирних кислот сприяє акти-
вному розвитку у світі нових біотехнологій
культивування цих організмів з метою одержання і
використання в промислових масштабах високо-
цінних медичних препаратів, продуктів харчуван-
ня, живих кормів для марикультури і т.д. У цьому
зв'язку, вивчення ліпідів (загальних ліпідів, фрак-
ційного і жирнокислотного складу) мікроводорос-
тей представляє значний практичний інтерес.

Відомий спосіб екстракції ліпідів із тканин тва-
рин і людини (печінки, серця, легень, нирок, су-
спензії субклітинних фракцій і еритроцитів плазми
крові) (див. Верболович В.П., Подгорный Ю.К.,
Теплова Л.Л., Куркаев Р.А. Экстракция липидов

для количественной оценки свободнорадикально-
го окисления. Лабораторное дело. - 1989. - 12. - С.
57 - 59]. Для виділення ліпідів 5г сирової тканини
гомогенізують 3хв. з 50мл суміші гек-
сан:ізопропіловий спирт (2:1) при 3000g. Кількість
необхідної для екстракції суміші підбирається в
співвідношенні тканина:екстрагуюча суміш (г/мл)
1:10. Надосадову рідину зливають у ділільну лій-
ку, додають 30мл 0,2M Na₂SO₄ і струшують протя-
гом 60с. Після поділу фаз відбирають гексановий
шар і проводять визначення вмісту ліпідів і т.д.
Недоліком даного способу є його неадаптованість
до роботи з одноклітинними водоростями, присут-
ність в отриманому екстракті ліпідів пігментів, що
стають на заваді при визначенні вмісту ліпідів, а
також трудомісткість способу.

Найбільш близьким за технічною суттю є спо-
сіб екстракції ліпідів з мікроводоростей класу
Eustigmatophyceae [Volkman J.K., Brown M.R.,
Dunstan G.A., Jeffrey S.W. The biochemical
composition of marine microalgae from the class
Eustigmatophyceae // J. Phycol. - 1993. - 29. - P. 69-
78]. У способі 10-20мг висушених у сублімаційній
установці мікроводоростей поміщають у пробірки
обсягом 5мл. Додають у пробірку 0,2мл диметил-
сульфоксида і оброблюють ультразвуком 5хв. Піс-
ля цього, у пробірку доливають 2мл суміші хлоро-
форм:метанол:вода в співвідношенні 2:4:1. Вміст

(13) U

(11) 24468

(19) UA

пробірки перемішують і центрифугують. Супернатант переносять в іншу пробірку, осад повторно екстрагують 2мл суміші хлороформ:метанол:вода в співвідношенні 2:4:1 до знебарвлення екстракту. Усі зібрані в одну пробірку екстракти розділяють на шар хлороформу і водно-метанольний шар шляхом додавання 5мл води і 5мл хлороформу. Шар хлороформу промивають 5мл води, концентрують під вакуумом і далі визначають вміст ліпідів.

Відомому способу властивий ряд недоліків:

- не повний вихід ліпідів, тому що застосовувана екстрагуюча суміш (хлороформ:метанол:вода) не дає повної екстракції ліпідів різної природи з одноклітинних водоростей;
- відсутність можливості звільнення від домішок неліпідної природи при поділі ліпідної і неліпідної фракцій;
- недостатня повнота очищення ліпідного екстракту (мутний ліпідний екстракт, окремі краплі невідомої природи, які важко збирати, по всьому обсязі пробірки і т.д.)
- метанол і хлороформ є надзвичайно токсичними речовинами.

В основу корисної моделі "Спосіб екстракції ліпідів і пігментів з одноклітинних водоростей" поставлена задача шляхом розробки нової технології, забезпечити дослідників простим, технологічним і надійним способом максимально повної екстракції ліпідів і пігментів з одноклітинних водоростей.

Поставлена задача досягається наступним шляхом. У Способі екстракції ліпідів і пігментів з одноклітинних водоростей, що включає екстракцію ліпідів і пігментів з мікроводоростей з використанням як екстрагуюча суміш розчинників гексан:ізопропіловий спирт (2:1). Сухі одноклітинні водорості розтирають із кварцовим піском, з'єднують з сумішшю для екстракції в співвідношенні 1:1 (мг/мл). Отриманий екстракт, фільтрують, збирають у мірну пробірку, куди, для деструкції пігментів, додають концентровану соляну кислоту (HCl) до досягнення прозорості і збліднення екстракту. Для кращого розшарування фаз додають 1-3 мл 5% NaCl.

Пропонований спосіб реалізується таким чином.

Мікроводорості розтирають у порцеляновій ступці з кварцовим піском і додають екстрагуючу

суміш гексан:ізопропіловий спирт (2:1) при співвідношенні суха маса мікроводоростей:екстрагуюча суміш 1:1 (мг/мл). Екстракцію ведуть поступово, доливаючи по 1-1,5мл суміші для екстракції. Кожну порцію переносять у мірну пробірку, відокремлюючи екстракт ліпідів і пігментів від осаду фільтруванням. Після повного знебарвлення останньої порції екстракту, процес екстракції ліпідів і пігментів вважається закінченим. Для руйнування пігментів у сумарний ліпідний екстракт додають концентровану соляну кислоту (HCl) поки екстракт не набуде солом'яного кольору. Після деструкції пігментів доливають 1мл 5% NaCl, а після розшарування видаляють нижню фазу екстракту, що містить неліпідні компоненти. Вимірюють отриманий обсяг ліпідного екстракту.

Приклад.

5мг сухої маси одноклітинної мікроводорості спіруліна *Spirulina platensis* розтирали в порцеляновій ступці з кварцовим піском і додавали 5мл екстрагуючої суміші гексан:ізопропіловий спирт (2:1). Екстракцію вели поступово, доливаючи по 1,5мл екстрагенту. Кожну порцію переносили в мірну пробірку, відокремлюючи екстракт ліпідів і пігментів фільтруванням. Після повного знебарвлення останньої порції екстракту, екстракція ліпідів і пігментів закінчена. Для подальшого визначення вмісту ліпідів руйнували пігменти. В сумарний ліпідний екстракт додавали 3 краплі концентрованої соляної кислоти до набуття екстрактом світло-солом'яного кольору. Після деструкції пігментів для розшарування доливали 1мл 5% NaCl і видаляли неліпідну фазу. Вимірювали отриманий обсяг ліпідного екстракту - він склав 4мл.

Після витягу ліпідів і пігментів з мікроводоростей, можна досліджувати якісний і кількісний склад їх різними методами. Запропонований спосіб має ряд переваг:

- запропонований новий ефективний спосіб повної екстракції ліпідів і пігментів з мікроводоростей;
- забезпечує екстракцію 97-98% ліпідів;
- виключає ряд трудомістких операцій (поділ у ділильній лійці, центрифугування), простий, доступний і технологічний;
- використовувані для екстракції розчинники менш токсичні, ніж хлороформ і метанол.