

BARBARA STACHOWIAK, ZBIGNIEW CZARNECKI

## DROŻDŻE *PHAFFIA RHODOZYMA* JAKO POTENCJALNE ŹRÓDŁO NATURALNEJ ASTAKSANTYNY

### Streszczenie

Astaksantyna należy do grupy barwników karotenoidowych. Znajduje ona powszechne zastosowanie jako niezbędny składnik pasz w przemysłowej hodowli łososi, pstrągów i krewetek, nadając tkankom tych zwierząt pożądane przez konsumenta, charakterystyczne różowoczerwone zabarwienie. Ponadto, astaksantyna charakteryzuje się dużą aktywnością przeciwutleniającą, najwyższą wśród znanych karotenoidów i 100-500-krotnie wyższą w porównaniu z  $\alpha$ -tokoferolem. Wśród preparatów astaksantyny, występujących na światowym rynku, 95% zawiera barwnik syntetyczny - mniej stabilny od astaksantyny pozyskiwanej ze źródeł naturalnych. Ograniczony zakres stosowania astaksantyny naturalnej wynika z kosztów jej otrzymywania, głównie na drodze syntezy mikrobiologicznej z udziałem alg *Haematococcus pluvialis*.

Potencjalnym źródłem astaksantyny naturalnej są drożdże *Phaffia rhodozyma*. Jako ewentualne przemysłowe źródło tego barwnika wykazują one wiele zalet. Przede wszystkim astaksantyna jest głównym produkowanym przez te drożdże karotenoidem. *Phaffia rhodozyma* są znacznie łatwiejsze w hodowli w porównaniu z algami. Jednak poważnym ograniczeniem w wykorzystaniu tych drożdży do syntezy astaksantyny na skalę przemysłową jest niska wydajność produkowanego przez nie barwnika, a także koszty związane z jego izolacją z komórek.

W artykule przedstawiono zakres i rezultaty badań dotyczących drożdży *Phaffia rhodozyma*, a także możliwości i ograniczenia w wykorzystaniu tych drożdży do przemysłowej produkcji astaksantyny. Omówiono najważniejsze czynniki wpływające na proces karotenogenezy w komórkach, w tym syntezę astaksantyny. Przedstawiono również możliwości pozyskiwania szczepów *Phaffia rhodozyma* zdolnych do nadprodukcji astaksantyny.

**Słowa kluczowe:** *Phaffia rhodozyma*, astaksantyna, mikrobiologiczna produkcja karotenoidów

### Wprowadzenie

Astaksantyna należy do grupy barwników karotenoidowych. W dużych ilościach występuje w środowisku morskim, gdzie bytują zdolne do jej syntezy algi, grzyby i małe skorupiaki. Do produkcji astaksantyny zdolne są również niektóre bakterie: *Agrobacterium auranticum*, *Mycobacterium lacticola*, *Brevibacterium spp.* [6, 11, 25]. Organizmy te znajdują się na początku łańcucha pokarmowego i w efekcie barwnik ten

jest akumulowany w tkankach dużych zwierząt np. mięsie różnych gatunków ryb (łosoś, pstrąg, leszcz czerwony), drobiu, przepiórek, w piórach flamingów, w dziobie i nogach bocianów, nadając im różowoczerwony kolor. W krewetkach i homarach astaksantyna występuje w połączeniach z białkami, tworząc karotenoproteiny odpowiedzialne za niebieskobłęzowe wybarwienie tych zwierząt. Podczas obróbki termicznej, np. podczas gotowania, następuje denaturacja karotenoprotein, astaksantyna jest uwalniana i pojawia się jasnoczerwone zabarwienie [4, 9, 27, 35, 37]. Żadne zwierzęta wyższe nie są zdolne do syntezy astaksantyny *de novo*, stąd intensywność wybarwienia ich tkanek zależy przede wszystkim od obecności źródeł tego barwnika w diecie. Jest to szczególnie ważne podczas przemysłowej hodowli łososia, pstrąga czy krewetek, gdyż barwa mięsa jest ważnym wyróżnikiem jakości. Wykazano również, że astaksantyna wpływa korzystnie na wybarwienie żółtka jaja oraz skóry i tkanki mięsnej tuszek brojlerów [1].

Ze względu na swoją budowę – 3,3'-dihydroksy- $\beta,\beta$ -karoten-4,4'-dion – astaksantyna postrzegana jest jako potencjalny przeciwutleniacz. Charakteryzuje ją 10-krotnie wyższa aktywność przeciwutleniająca w porównaniu z pozostałymi karotenoidami:  $\beta$ -karotenem, zeaksantyną, luteiną, kantaksantyną oraz 100-500 razy wyższa w porównaniu z  $\alpha$ -tokoferolem [20, 21, 23]. Z uwagi na silne właściwości przeciwutleniające astaksantyna zaliczana jest do grupy substancji bioaktywnych, tj. nutraceutyków, chętnie przyjmowanych w pożywieniu w ramach normalnej diety. Barwnik ten znajduje coraz większe zainteresowanie wśród producentów żywności, jako składnik o cechach funkcjonalnych.

W najbliższym czasie należy spodziewać się wzrostu popytu na astaksantynę naturalną. Przyczyną tego jest panujący trend zdrowego odżywiania, a więc spożywania produktów naturalnych i mało przetworzonych, wzbogaconych w naturalne dodatki, w tym barwniki. Ponadto, użycie chemicznie syntetyzowanych związków jako dodatków do żywności podlega w wielu krajach ograniczeniom [16, 36]. Zaletą astaksantyny naturalnej jest wyższa stabilność i oporność na procesy fotoutleniania. Jest to związane z jej budową chemiczną – astaksantyna naturalna ma wszystkie wiązania podwójne w konfiguracji *trans*, podczas gdy syntetyczna jest *cis*-izomerem [4, 20, 37].

W chwili obecnej, czysta astaksantyna, a także produkty zawierające w swoim składzie astaksantynę, dostępne na rynku krajowym, pochodzą z importu. Szacuje się, że 95% preparatów tego barwnika otrzymywane jest na drodze syntezy chemicznej. Astaksantyna naturalna pozyskiwana jest z mikroalg *Haematococcus pluvialis* oraz drożdży *Phaffia rhodozyma* (syn. *Xanthophyllomyces dendrorhous*) [21]. Najpoważniejszym ograniczeniem powszechnego stosowania naturalnej astaksantyny na skalę przemysłową są koszty jej pozyskiwania, istotnie wyższe od kosztów otrzymywania astaksantyny syntetycznej [6, 16, 21]. Zatem wykorzystanie drobnoustrojów do produkcji naturalnej astaksantyny na skalę przemysłową będzie możliwe pod warunkiem uczynienia tego procesu opłacalnym.

Obecnie prowadzone są intensywne badania naukowe nad poprawą syntezy astaksantyny w komórkach mikroorganizmów, przy czym znacząca część tych badań dotyczy drożdży *P. rhodozyma*. Jako potencjalne przemysłowe źródło astaksantyny drożdże te wykazują szereg zalet. Przede wszystkim wśród ogólnej liczby produkowanych przez nie karotenoidów astaksantyna stanowi 83–87% [10], a więc jest głównym barwnikiem gromadzonym w komórce. Do syntezy astaksantyny i wzrostu komórek drożdżowych nie jest wymagane światło. Drożdże te asymilują glukozę i inne węglowodany zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych, co wyróżnia je spośród innych drożdży produkujących karotenoidy, które są bezwzględnie tlenowcami. Ponadto podczas hodowli prowadzonych w fermentorze można uzyskać wysoką wydajność biomasy komórkowej, nawet ponad 50 g s.m./l hodowli. Zatem drożdże te są znacznie łatwiejsze i tańsze w hodowli w porównaniu z *Haematococcus pluvialis*. [2, 24]. Jednak ilość otrzymanywanej astaksantyny ze szczepów dzikich drożdży – 0,2–0,4 g/kg s.m. jest znacznie niższa niż w przypadku alg hodowanych przemysłowo, które akumulują ponad 30 g astaksantyny w przeliczeniu na 1 kg suchej biomasy [16, 21, 34]. Szacuje się, że pozyskanie szczepów drożdży *P. rhodozyma* zdolnych do syntezy astaksantyny na poziomie 5–10-krotnie wyższym niż w przypadku szczepów dzikich, mogłoby znacznie obniżyć koszty wytwarzania preparatów naturalnej astaksantyny, a tym samym jej cenę rynkową. Prace badawcze nad intensyfikacją produkcji tego barwnika w komórkach drożdży *P. rhodozyma* mają charakter dwukierunkowy. Pierwszy związany jest z optymalizacją warunków hodowlanych m.in. doбором składu podłoża wzrostowego, temperatury, pH, oświetlenia. Drugi kierunek obejmuje badania związane z izolacją szczepów *P. rhodozyma* zdolnych do nadprodukcji astaksantyny. Szczepy takie pozyskiwane są najczęściej poprzez wywołanie mutacji punktowych u szczepów dzikich, z zastosowaniem typowych czynników mutagennych lub na drodze inżynierii genetycznej poprzez tworzenie rekombinantów zdolnych do syntezy tego barwnika [4, 10].

### **Charakterystyka drożdży *Phaffia rhodozyma***

Drożdże *Phaffia rhodozyma* (formalnie *Xanthophyllomyces dendrorous*) zostały wyizolowane po raz pierwszy około 1967 r. przez holenderskiego mikrobiologa Phaffa i jego współpracowników. Izolacji dokonano z lepkich wydzielin drzew liściastych rosnących w górskich regionach Japonii i Alaski. Izolację barwników z komórek oraz ich analizę jakościową przeprowadził Andrews i to on po raz pierwszy stwierdził, że astaksantyna jest głównym karotenoidem syntetyzowanym przez *Phaffia rhodozyma*. W latach 1970–1990 dokonano dalszych izolacji tych drożdży, w Finlandii, Rosji i innych regionach świata [19].

Systematyka drożdży *Phaffia rhodozyma* nie jest do końca wyjaśniona. Pierwsze izolaty przypisano do gatunku *Phaffia rhodozyma* i umieszczono w klasie *Basidiomycetes*, uwzględniając ich morfologię, budowę ściany komórkowej, sposób pączkowania, pigmentację, właściwości metaboliczne itp. [19]. Jednak przez bardzo

długi czas nie udało się zaobserwować cyklu płciowego u tych drożdży. Cykl ten po raz pierwszy zaobserwowano dopiero w 1995 r. i wówczas zakwalifikowano szczepy telemorficzne do nowego gatunku – *Xanthophyllomyces dendrorous* [14]. W chwili obecnej uważa się, że wszystkie szczepy drożdży *Phaffia rhodozyma* są zdolne do rozmnażania płciowego i tworzenia form telemorficznych, a więc prawidłowa nazwa tego gatunku powinna brzmieć *Xanthophyllomyces dendrorous*. Jednak w niektórych przypadkach obserwowane są jedynie formy anamorficzne. Przypuszczalnie ta różnorodność morfologiczna związana jest z miejscem izolacji drożdży, regionem geograficznym, a także z wieloma innymi czynnikami środowiskowymi. Golubev [14], a także Retamales i wsp. [28] podają, że tworzenie długich holobasidiów z terminalnymi basidiosporami wymaga stworzenia specjalnych warunków wzrostu drożdżom, a wymienione struktury obserwowano jedynie na podłożach zawierających wielowodorotlenowe alkohole. Fakt ten, ale przede wszystkim wieloletnie przyzwyczajenie są przyczyną, że w literaturze, również naukowej, funkcjonuje podwójna nomenklatura tych drożdży, przy czym częściej stosowana jest nazwa gatunkowa *Phaffia rhodozyma*.

Powszechnym sposobem rozmnażania się *Phaffia rhodozyma* jest pączkowanie. Pączki mogą tworzyć się kilka razy w tym samym miejscu na powierzchni komórki. W wyniku pączkowania tworzą się również sferyczne chlamydospory, znacznie większe i zawierające więcej tłuszczu niż komórki wegetatywne. Wegetatywne komórki *Phaffia rhodozyma* mają kształt elipsoidalny i przyjmują rozmiary 3,6–7,5 x 5,5–10,5  $\mu\text{m}$ . W pożywkach płynnych komórki występują pojedynczo, w parach, niekiedy łączą się w krótkie łańcuszki lub tworzą małe skupiska. Drożdże te nie tworzą grzybni właściwej, ale można zaobserwować szczątkową pseudogrzybnię. Na stałym podłożu YM rosną w postaci nalotu o zabarwieniu od pomarańczowego do łososiowo-różowego, w zależności od szczepu. *Phaffia rhodozyma* ma grube, wielowarstwowe ściany komórkowe. Barwnik w pojedynczej komórce drożdżowej jest niewidoczny podczas obserwacji mikroskopowych. Może to wskazywać, że jest on rozproszony w całej objętości komórki lub też, że jest skoncentrowany w pewnych jej rejonach [10, 19, 28].

### **Wpływ czynników środowiskowych na wydajność astaksantyny w komórkach drożdży *Phaffia rhodozyma***

Na proces karotenogenezy w drożdżach *Phaffia rhodozyma*, a tym samym na syntezę astaksantyny, ogromny wpływ mają czynniki fizyczne, przede wszystkim temperatura hodowli i pH oraz skład podłoża hodowlanego. Wśród składników podłoża wymienia się najczęściej: rodzaj i stężenie źródła węgla, azotu (organiczny, nieorganiczny), również stosunek C:N, dodatek fosforanów oraz specyficznych prekursorów astaksantyny np. kwasu mewalonowego, cytrynianów. Najnowsze badania wskazują także na możliwość stymulacji karotenogenezy w komórkach tych

drożdży poprzez dodatek do podłoża wzrostowego płynów pochodzących innych mikroorganizmów lub ich ekstraktów komórkowych.

#### *Czynniki fizyczne*

Większość danych literaturowych wskazuje, że optymalna temp. wzrostu dzikich szczepów *Phaffia rhodozyma* zawiera się w zakresie 20–22°C. Drożdże te nie rosną w temp. poniżej 18°C i powyżej 27°C. W przypadku mutantów optimum temperaturowe jest zmienne i specyficzne dla danego szczepu. Fang i Chen [8] otrzymali mutant, który najwięcej astaksantyny produkował w 15°C.

Dobry wzrost i wysoki poziom syntetyzowanej astaksantyny uzyskuje się, prowadząc hodowlę zarówno dzikich szczepów *Phaffia rhodozyma*, jak i ich mutantów przy pH = 5,0. Jednak Vazquez i Martin [33], w badaniach nad *Phaffia rhodozyma* ATCC 24202, najwyższą wydajność biomasy drożdżowej, jak i najwyższą wydajność astaksantyny z jednostki objętości hodowli obserwowali w środowisku o pH = 6,9. Natomiast Ramirez i wsp. [27], hodując mutant ww. szczepu zdolny do nadprodukcji astaksantyny na podłożu *Yucca*, uzyskali wysoką pigmentację w zakresie pH 4,0–6,0. Wykazali również, że czynniki wpływające na syntezę astaksantyny należy optymalizować łącznie. W swych badaniach uwzględnili zarówno czynniki fizyczne, jak i wybrane składniki pokarmowe. Stosując model płaszczyzny odpowiedzi opracowali warunki hodowli, w których badany szczep produkował o 92% więcej astaksantyny niż w hodowli kontrolnej.

W literaturze niewiele jest informacji na temat roli oświetlenia w produkcji astaksantyny przez szczepy *Phaffia rhodozyma*, chociaż sam proces karotenogenezy w komórkach mikroorganizmów najprawdopodobniej podlega fotoregulacji. Udowodniono, że światło stymuluje syntezę karotenoidów w grzybach *Phycomyces*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus giganteus*, *Gibberella fujikuroi*, *Rhodotorula minuta*, lecz ogranicza u *Trichophyton mentagrophytes* i *Blakeslea trispora* [22]. W przypadku drożdży *Phaffia rhodozyma* uważa się, że brak światła nie wpływa na ich wzrost i na zdolność syntezy astaksantyny. Jednak nieliczne prace wskazują, że proces karotenogenezy w ich komórkach również podlega fotoregulacji. Vazquez [32], prowadząc badania nad sześcioma szczepami *Phaffia rhodozyma*, w tym jednym mutantem, wykazał, że oświetlenie nie tylko w wyraźny sposób sprzyjało produkcji karotenoidów, ale również miało wpływ na rodzaj syntetyzowanych przez te drożdże barwników.

#### **Skład podłoża hodowlanego**

Jednym z głównych czynników środowiskowych, mających zasadniczy wpływ na produkcję astaksantyny przez *Phaffia rhodozyma* jest skład podłoża wzrostowego. Standardowe podłoże do hodowli tych drożdży – podłoże YM - zawiera źródło węgla, organiczne źródło azotu – pepton oraz ekstrakt drożdżowy i ekstrakt słodowy. Najczęściej stosowanym źródłem węgla jest glukoza. Wydajność karotenoidów

pozyskiwanych z drożdży *P. rhodozyma* hodowanych na podłożach zawierających ten cukier wynosi 0,3-1,6 g/kg s.m. drożdży w zależności od szczepu (dziki, mutant), metody hodowli (okresowa, zasilana) i pozostałych składników podłoża.

Większość szczepów *Phaffia rhodozyma* jest zdolna również do utylizacji D- i L-ksylozy, D-maltozy, D-mannozy, sacharozy, L-arabinozy, D-celobiozy, D-rafinozy, D-fruktozy, D-melecytozy, skrobi, cytydyny, kwasu 2-keto-D-glukonowego, kwasu L-jabłkowego, etanolu, kwasu szczawiowego, octowego, laktonu kwasu D-glukonowego, arbutyny, salicyny, trehalozy i innych, często nietypowych związków zawierających węgiel [24]. Dobór podłoża hodowlanego nie następuje zatem trudnościami. Drożdże te chętnie rosną na wielu odpadach przemysłu rolno-spożywczego np. melasie [17], hydrolizatach drzewnych [26], śrucie kukurydzianej [18], a także wyciągach roślinnych - soku winogronowym [33] i daktylowym [27]. Wymienione podłoża są tanie, zawierają niezbędne substancje wzrostowe dla *P. rhodozyma* i bardzo często niezidentyfikowane stymulatory biosyntezy astaksantyny, bowiem wydajność tego barwnika z hodowli drożdżowych na nich prowadzonych zwykle jest wyższa niż z hodowli na syntetycznym podłożu YM. Pewną wadą tych podłoży jest jednak brak możliwości precyzyjnego zdefiniowania ich składu oraz zmienność, a co za tym idzie brak powtarzalności przebiegu hodowli i ilości otrzymywanych barwników. W tym przypadku ocena wpływu poszczególnych składników odżywczych na wzrost i pigmentację *P. rhodozyma* jest trudna, a sformułowane wnioski mogą okazać się błędne. Z tego względu badania nad rolą podstawowych składników podłoża hodowlanego na wzrost i pigmentację drożdży *P. rhodozyma* prowadzone są najczęściej na podłożach syntetycznych, o ściśle określonym składzie.

Yamane i wsp. [35], badając wpływ różnych źródeł węgla na produkcję astaksantyny przez szczep *P. rhodozyma* 24202, stwierdzili najwyższą akumulację barwnika w komórkach drożdży w hodowlach z dodatkiem etanolu. Produkcja ta była o 80% wyższa niż uzyskana w hodowlach kontrolnych na podłożu z glukozą. Jednak etanol silnie hamował wzrost drożdży, co w efekcie wpływało na niską wydajność astaksantyny z jednostki objętości hodowli. W dalszych badaniach wykazano, że priorytetowe źródło węgla, w porównaniu z etanolem, stanowi glukoza. W celu uzyskania wyższych wydajności astaksantyny z jednostki objętości hodowli zaproponowano zatem przeprowadzenie jej w dwóch etapach. W pierwszym, hodowlę zasilano glukozą i uzyskiwano wysoki plon biomasy komórkowej drożdży – 30 g/L. W drugim etapie, w celu intensyfikacji syntezy astaksantyny, jako źródło węgla stosowano etanol. W efekcie uzyskano 2,4 razy więcej astaksantyny w przeliczeniu na 1 litr hodowli w porównaniu z hodowlą kontrolną, bez dodatku etanolu. Korzystny wpływ etanolu na produkcję astaksantyny wykazali także Gu i wsp. [15], prowadząc hodowlę drożdży *Phaffia rhodozyma* na podłożu zawierającym 0,2% alkoholu.

Dane literaturowe wskazują również na ksylozę jako potencjalne źródło węgla dla drożdży *P. rhodozyma*. Na skalę przemysłową cukier ten można otrzymać poprzez hydrolizę kwasową materiałów roślinnych, takich jak drewno, lub odpadów przemysłu rolnego. Parajó i wsp. [25], w badaniach nad optymalizacją syntezy astaksantyny przez

szczep *P. rhodozyma* NRRL Y-17268, stosowali pożywkę YM, w której glukozę zastąpiono ksylozą. Dodatkowo do podłoża wprowadzali nieorganiczne źródło azotu: fosforan(V) amonu, siarczan(VI) amonu, azotan(V) amonu i azotan(V) potasu. Najwyższe wydajności astaksantyny uzyskali w hodowlach z dodatkiem azotanu(V) potasu. Uzyskane wyniki były 1,5 razy wyższe niż w hodowlach kontrolnych bez dodatku nieorganicznego źródła azotu. Największy wzrost drożdży i najniższe wydajności astaksantyny obserwowano w hodowlach z dodatkiem fosforanu(V) amonu.

Flores-Cotera i wsp. [11] podjęli próbę wyjaśnienia wpływu amoniaku, fosforanów i cytrynianów na wzrost i produkcję astaksantyny przez *P. rhodozyma*. Uzyskane przez nich wyniki wskazują, że niski poziom suplementacji podłoża amoniakiem, jako źródłem azotu w podłożu, a także fosforanami wyraźnie sprzyja karotenogenezie, a także akumulacji kwasów tłuszczowych w komórce. Towarzyszy temu jednak obniżona synteza białek. Autorzy sugerują, że wskutek obniżonej zawartości azotu w podłożu, stosunek C:N wzrasta, a nadmiar węgla, ATP i NADPH, powstały w wyniku ograniczonej syntezy białek, jest wykorzystywany przez drożdże do produkcji karotenoidów i kwasów tłuszczowych. Deficyt fosforanów w podłożu również ograniczał syntezę białek komórkowych i w efekcie sprzyjał karotenogenezie i produkcji kwasów tłuszczowych. Natomiast stężenie cytrynianów w podłożu na poziomie 28,9 mM i wyższym sprzyjało produkcji barwników karotenoidowych, jednak ilość syntetyzowanej astaksantyny obniżyła się. Cytryniany są związkami wyjściowymi w syntezie acetylo-CoA, który z kolei jest prekursorem kwasów tłuszczowych, a także barwników karotenoidowych. Przymuszczenie podczas ograniczonej syntezy białek komórkowych, dostępność tego związku, a także ATP może pełnić kluczową rolę w biosyntezie karotenoidów i kwasów tłuszczowych.

Interesujących obserwacji dokonali Echavarri-Erasun i Johnson [7], prowadząc rutynowe hodowle *X. dendrorhous* UCD 67-385 i jego mutantów. Przypadkowe skażenie jednej z płytek grzybem *Epicoccum nigrum* spowodowało wyraźny wzrost pigmentacji kolonii drożdżowych w sąsiedztwie i to zarówno w przypadku szczepu dzikiego, jak i jego albino- i  $\beta$ -karotenowych mutantów. W celu dokładniejszego zbadania interakcji zachodzących pomiędzy tymi dwoma mikroorganizmami autorzy przygotowali skoncentrowane płyny pohodowlane *Epicoccum nigrum*, które wprowadzili do podłoża wzrostowego drożdży *X. dendrorhous*. W przypadku szczepu dzikiego, jak i jego mutantu zdolnego do nadprodukcji astaksantyny, uzyskali oni blisko 40% wzrost wydajności syntetyzowanego barwnika w hodowlach zawierających 20% dodatek płynu pohodowlanego grzyba. Również w przypadku pozostałych mutantów – albino- i  $\beta$ -karotenowego, u których stwierdzono brak zdolności syntezy astaksantyny w standardowych warunkach, obserwowali oni niewielką produkcję tego barwnika na podłożach zawierających dodatek skoncentrowanego płynu pohodowlanego *Epicoccum nigrum*. Te zaskakujące obserwacje skłoniły autorów badań do wysunięcia przypuszczeń, że mutacje szczepów *X. dendrorhous* dotyczą genów regulatorowych, a nie, jak dotąd sądzono, strukturalnych. Mechanizm

stymulacji karotenogenezy u *X. dendrorhous* UCD 67-385 i jego mutantów przez płynty pochodzące *Epicoccum nigrum* nie jest wyjaśniony. Grzyb ten należy do patogenów roślinnych i jest zdolny do syntezy wielu metabolitów wtórnych m.in. izoprenoidów, które są prekursorami barwników karotenoidowych. Produkuje on również flawonoidy i karotenoidy tworzące się w pierwszych etapach biosyntezy karotenoidów. Zatem obecność tych związków w środowisku może podnosić wydajność syntezy astaksantyny w komórkach drożdży *X. dendrorhous*. Calo i wsp. [3] wykazali, że również kwas mewalonowy, który jest związkiem wyjściowym w szlaku przemian karotenoidów, zwiększa syntezę astaksantyny przez *P. rhodozyma*. Z drugiej jednak strony zwiększona wydajność barwnika może być odpowiedzią komórki na obecność związków utleniających np. enzymów rozkładających ściany komórkowe roślin, wydzielanych przez *Epicoccum nigrum*. Proces ten prowadzi do tworzenia się reaktywnych form tlenu, takich jak  $H_2O_2$  i  $^1O_2$ . Schroeder i Johnson [31] stwierdzili, że związki te stymulują produkcję astaksantyny przez *P. rhodozyma*.

### **Otrzymywanie szczepów drożdży *Phaffia rhodozyma* zdolnych do nadprodukcji astaksantyny**

Szczepy zdolne do nadprodukcji astaksantyny pozyskiwane są najczęściej poprzez wywołanie mutacji punktowych szczepów dzikich z zastosowaniem typowych czynników mutagennych lub metodą inżynierii genetycznej poprzez tworzenie rekombinantów zdolnych do syntezy tego barwnika [4, 10]. Mutacje prowadzą do otrzymania szczepów syntetyzujących karotenoidy na bardzo zróżnicowanym poziomie i o bardzo zróżnicowanym profilu. W ich efekcie otrzymywane są również szczepy niezdolne do syntezy tych barwników, u których mutacje miały miejsce we wczesnych etapach karotenogenezy – już na etapie syntezy fiteonu. Generalnie, proces mutagenizacji generuje trzy typy mutantów tj. (1) szczepy akumulujące w komórkach  $\beta$ -karoten – gdy mutacja nastąpi na etapie utleniania  $\beta$ -karotenu do astaksantyny, (2) bezbarwne szczepy akumulujące fiteon, który jest postrzegany jako macierzysty związek karotenoidów – w tym przypadku mutacje dotyczą genów kodujących dehydrogenazę fiteonu. Otrzymywane są również szczepy (3), których kolonie mają głęboką łososiową, a nawet bordową barwę, a więc szczepy zdolne do nadprodukcji astaksantyny. Nie spotyka się szczepów akumulujących likopen [13]. Udało się wyizolować kilka mutantów drożdży *Phaffia rhodozyma* zdolnych do kilkukrotnie wyższej syntezy astaksantyny w porównaniu ze szczepami rodzicielskimi [2, 4, 10]. Jednak dopiero uzyskanie mutantu zdolnego do syntezy barwnika w ilości 4 g/kg s.m. czyni naturalne preparaty astaksantyny konkurencyjnymi cenowo w stosunku do preparatów syntetycznych. Częstym problemem pojawiającym się podczas hodowli mutantów zdolnych do syntezy astaksantyny na poziomie przekraczającym 1,5 g/kg s.m. jest bardzo niska wydajność biomasy komórkowej, co przekłada się na niską wydajność barwnika z jednostki objętości hodowli. Rozwiązaniem tego problemu wydaje się być izolacja mutantów opornych na inhibitory dehydrogenazy fiteonu:



alkohol cynamonowy, tymol, difenyloaminę (DPA), a więc związki blokujące karotenogenezę, jednak nie hamujące wzrostu biomasy komórkowej. Szczególnie obiecujące wyniki uzyskano w przypadku kilku mutantów opornych na obecność DPA w podłożu wzrostowym, u których stwierdzono dwukrotnie wyższą akumulację astaksantyny w komórkach, w porównaniu ze szczepami rodzicielskimi. Cecha ta pozostawała trwała również po wysianiu mutantów na podłoże pozbawione DPA [5].

Do pozyskiwania szczepów zdolnych do syntezy astaksantyny wykorzystywane są również metody inżynierii genetycznej. Do tych celów wykorzystywane są przede wszystkim niepatogenne szczepy *E. coli* [12, 29]. Tego typu zabiegi wymagają uprzedniej izolacji genów kodujących enzymy biorące udział w szlaku przemian karotenoidów. Obecnie wyizolowano ponad 150 genów kodujących 24 różne enzymy szlaku przemian karotenoidów [30]. Jednak wykorzystanie rekombinantów *E. coli* do produkcji karotenoidów jest ograniczone z uwagi na niski poziom w ich komórkach izoprenoidowych prekursorów – IDP, DMADP, GGDP – niezbędnych do biosyntezy karotenoidów. Zatem poziom produkcji barwników karotenoidowych, a przede wszystkim astaksantyny przez rekombinanty *E. coli* pozostaje bardzo niski – 10–500 µg/g s.m. w porównaniu z powszechnie znanymi producentami tych barwników – *Haematococcus pluvialis* i *Phaffia rhodozyma*. Badania nad otrzymywaniem zmienionych genetycznie mikroorganizmów zdolnych do syntezy astaksantyny i innych karotenoidów mają raczej znaczenie poznawcze. Wprowadzając odpowiednią kombinację genów do rekombinowanego mikroorganizmu można zmusić go do syntezy karotenoidów o bardzo zróżnicowanej budowie strukturalnej, które często nie występują w środowisku naturalnym i są trudne do otrzymania na drodze syntezy chemicznej. Z uwagi na właściwości prozdrowotne karotenoidów badania te są bardzo cenne [30, 34].

### Podsumowanie

Drożdże *Phaffia rhodozyma* budzą duże zainteresowanie naukowców od momentu ich izolacji, przede wszystkim ze względu na swą unikalną zdolność do syntezy astaksantyny. Od około dwudziestu lat zaczęły być postrzegane jako potencjalne przemysłowe źródło tego barwnika i od tego czasu rozpoczęto intensywne badania naukowe nad poprawą syntezy astaksantyny w ich komórkach. Badania są wielokierunkowe i obejmują wiele aspektów związanych z poznaniem fizjologii wzrostu tych drożdży, optymalizacją środowiska ich wzrostu, a także z pozyskiwaniem szczepów zdolnych do nadprodukcji astaksantyny na drodze mutagenizacji lub z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej. Odrębny kierunek badań stanowi opracowanie prostej i taniej metody izolacji karotenoidów z komórek drożdżowych mających grube, wielowarstwowe ściany.

W chwili obecnej wykorzystanie drożdży *Phaffia rhodozyma* do przemysłowej produkcji astaksantyny ma znaczenie ograniczone, przede wszystkim z uwagi na koszty. Jednak niewątpliwym sukcesem jest opracowanie preparatu tzw. astaksantyny

wzbogaconej, który jest dostępny w sprzedaży i dopuszczony w żywieniu łososi i pstrągów we wszystkich krajach Unii Europejskiej. Preparat ten, to skoncentrowana biomasa nieaktywnych drożdży *P. rhodozyma* ATCC 74219, zawierająca co najmniej 4 g astaksantyny w 1 kg suchej substancji.

Badania nad opracowaniem opłacalnej technologii otrzymywania naturalnej astaksantyny z udziałem drożdży *Phaffia rhodozyma* są prowadzone przez wiele laboratoriów naukowych i przemysłowych i wskazują, że jest to temat wciąż atrakcyjny. Najnowsze odkrycia naukowe dotyczą między innymi stymulacji karotenogenezy w komórkach drożdżowych przez inne mikroorganizmy, a także roli oświetlenia w tym procesie.

### Literatura

- [1] Akiba Y., Sato K., Takahashi K., Takahashi Y., Furuki A., Konashi S., Nishida H., Tsunekawa H., Hayasaka Y., Nagao H.: Pigmentation of egg yolk with yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentration of astaxanthin in laying hens fed on a low-carotenoid diet. *J. Poultry Sci.*, 2000, **37/2**, 77-85.
- [2] An G.-H., Schuman D.B., Johnson E.A.: Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, **55**, 116-124.
- [3] Calo P., De Miguel T., Jorge B., Vila T.G.: Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Lett.*, 1995, **17**, 575-578.
- [4] Calo P., Velázquez J.B., Sieiro C., Blanco P., Longo E., Villa T.G.: Analysis of astaxanthin and other carotenoids from several *Phaffia rhodozyma* mutants. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 1396-1399.
- [5] Chumpolkulwong N., Kakizono T., Nagai S., Nishio N.: Increased astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants isolated as resistant to diphenylamine. *J. Ferment. Bioeng.*, 1997, **83/5**, 429-434.
- [6] Domínguez-Bocanegra A.R., Legarreta I.G., Jeronimo F.M., Campocoso A.T.: Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.*, 2004, **92**, 209-214.
- [7] Echavarrí-Erasun C., Johnson E.A.: Stimulation of astaxanthin formation in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by the fungus *Epicoccum nigrum*. *FEMS Yeast Res.*, 2004, **4**, 511-519.
- [8] Fang T.J., Chen Y.S.: Improvement of astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *J. Ferment. Bioeng.*, 1993, **75**, 466-469.
- [9] Fang T.J., Wang J.-M.: Extractability of astaxanthin in mixed culture of a carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation. *Proc. Biochem.*, 2002, **37**, 1235-1245.
- [10] Flen S.B., Christensen I., Larsen R., Johansen S.R., Johnson E.A.: Astaxanthin-producing yeast cells, methods for their preparation and their use. *U.S. Pat.* 1999, No.5,712,110.
- [11] Flores-Cotera L.B., Martín R., Sánchez S.: Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: Influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in chemically defined medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **55**, 341-347.
- [12] Fraser P.D., Miura Y., Misawa N.: *In vitro* characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *JBC.*, 1997, **227/10**, 6128-6135.
- [13] Girard P., Falconnier B., Bricout J., Vladescu B.: Beta-carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994, **41/2**, 183-191.
- [14] Golubev W.I.: Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*); *Yeast.*, 1995, **11**, 101-110

- [15] Gu W.L., An G. H., Johnson E.A.: Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. J. Indust. Microbiol. Biotech., 1997, **19/2**, 114-117.
- [16] Guerin M., Huntley M.E., Olaizola M.: *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. Trends in Biotech., 2003, **21/5**, 210-216.
- [17] Haard N.F.: Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. Biotechnol. Lett., 1988, **10**, 609-614.
- [18] Hayman G.T., Mannarelli B.M., Leathers T.D.: Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed of corn wet-milling co-products. J. Indus. Microbiol., 1995, **14**, 389-395.
- [19] Johnson E.A.: *Phaffia rhodozyma*: Colorful odyssey. Int. Microbiol., 2003, **6**, 169-174.
- [20] Lim G.-B., Lee S.-Y., Lee E.-K., Haam S.-J., Kim W.-S.: Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. Biochem. Engin. J., 2002, **11**, 181-187.
- [21] Lorenz R.T., Cysewski G.R.: Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Tibtech., 2000, **18**, 160-167.
- [22] Meyer P.S., du Preez J.C.: Photo-regulated astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants. Syst. Appl. Microbiol., 1994, **17**, 24-31.
- [23] Naguib Y. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. J. Agr. Chem., 2000, **48**, 1150-1154.
- [24] Palágyi Zs., Ferenczy L., Vágvölgyi Cs.: Carbon-source assimilation pattern of astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. World J. Microbiol. Biotech., 2001, **17**, 95-97.
- [25] Parajó J.C., Santos V., Vázquez M.: Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. Process Biochem., 1998, **33/2**, 181-187.
- [26] Parajó J.C., Santos V., Vázquez M., Cruz J.M.: Production of carotenoids by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic hydrolysates of prehydrolysed wood. Food Chem., 1997, **60/3**, 347-355.
- [27] Ramirez J., Gutierrez H., Gschaedler A.: Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology. J. Biotech., 2001, **88**, 259-268.
- [28] Retamales P., Hermosilla G., León R., Martínez C., Jiménez A., Cifuentes V.: Development of the sexual reproductive cycle of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. J. Microbiol. Methods, 2002, **48**, 87-93.
- [29] Sandmann G.: Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. Arch. Biochem. Biophys., 2001, **385/1**, 4-12.
- [30] Schmidt-Dannert C.: Engineering novel carotenoids and microorganisms. Environ. Biotechnol., 2000, **11**, 255-261.
- [31] Schroeder W.A., Johnson E.A.: Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. J. Biol. Chem., 1995, **270**, 18374-18379.
- [32] Vázquez M.: Effect of the light on carotenoid profiles of *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains (formerly *Phaffia rhodozyma*). Food Technol. Biotechnol., 2001, **39/2**, 123-128.
- [33] Vázquez M., Martín A.M.: Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. Biotech. Bioeng., 1998, **57/3**, 314-320.
- [34] Visser H., van Ooyen A.J.J., Verdoes J.C.: Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Yeast Res., 2003, **1590**, 1-11.
- [35] Yamane Y.-I., Higashida K., Nakashimada Y., Kakizono T., Nishio N.: Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding. Biotech. Lett., 1997, **19/11**, 1109-1111.
- [36] Yamane Y.-I., Higashida K., Nakashimada Y., Kakizono T., Nishio N.: Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. Appl. Environ. Microbiol., 1997, **63**, 4471-4478.
- [37] Yuan J.-P., Chen F.: Kinetics for the reversible isomerization reaction of trans-astaxanthin. Food Chem., 2001, **73**, 131-137.

**PHAFFIA RHODOZYMA YEASTS AS A POTENTIAL SOURCE OF A NATURAL  
ASTAXANTHIN**

S u m m a r y

Astaxanthin belongs to the carotenoid pigments group. Generally, it is used in aquaculture industry as a necessary constituent of feeds for salmon, trout and shrimps to attain their characteristic pink-red color and consumer acceptance. Moreover astaxanthin is characterized by a high antioxidant activity, the highest among known carotenoids and 100-500-times higher in compare to  $\alpha$ -tocopherol. 95% astaxanthin preparations presented on worldwide market contain synthetically derived pigment – less stable than astaxanthin from natural sources. Limited scale of natural astaxanthin usage is associated with costs of its microbiological synthesis mainly with *Haematococcus pluvialis* microalga.

A potential source of natural astaxanthin is *Phaffia rhodozyma* yeasts. As a possible industrial source of this pigment, they have some advantageous properties. First of all astaxanthin is synthesized as a principal carotenoid. Moreover cultivation of *Phaffia rhodozyma* yeasts is easier than microalga. The key limitation of employing these yeasts to microbiological synthesis of astaxanthin on industrial scale is a low yield of this pigment and costly extraction methods.

The area and research results performed on *Phaffia rhodozyma* yeasts are presented in the paper. Moreover there are showed possibilities and some limitations in employing these yeasts to industrial production of astaxanthin. It is pointed to the most important agents involved in carotenogenesis process including astaxanthin synthesis in *Phaffia rhodozyma* cells. The possibilities of astaxanthin overproducing strains obtaining are presented too.

**Key words:** *Phaffia rhodozyma*, astaxanthin, microbial production of carotenoids ☒