УДК 663.12/.14:547.979.8

# ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ КАРОТИНОЇДІВ У МУТАНТІВ ДРІЖДЖІВ *Phaffia rhodozyma (Xanthophyllomyces dendrorhous)*

*С. В. Гураль*[1]
*Г. В. Колісник*[1]
*Д. О. Климишин*[1]
*М. В. Гончар*[2, 3]

[1]Інститут біології тварин НААН України, Львів
[2]Інститут біології клітини НАН України, Львів
[3]Жешувський університет, факультет біотехнології, Кольбушова, Польща

*E-mail: g_svitlana@ukr.net*

Під дією ультрафіолетового проміння та нітрозогуанідину зі штаму дріжджів *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268 одержано групу мутантів, здатних утворювати пігменти жовтого, оранжевого, коричневого і рожевого кольорів. Пігменти мутантів виділено й очищено за допомогою тонкошарової хроматографії, визначено їхню хроматографічну рухливість та спектри поглинання світла. У біомасі отриманих мутантів ідентифіковано *цис*-астаксантин, *транс*-астаксантин, фоєнікоксантин, β-каротин, ζ-каротин, фітоєн та зеаксантин. Найпродуктивніші мутанти синтезують до 940 мкг каротиноїдів на 1 г сухої біомаси, серед яких основну частину становить астаксантин.

***Ключові слова:*** дріжджі *Phaffia rhodozyma*, каротиноїди, астаксантин, менадіон, нітрозогуанідин.

Каротиноїди — розчинні у жирах органічні сполуки, які за хімічною будовою належать до класу терпенів; поширені як у фотосинтезуючих, так і в нефотосинтезуючих організмах. Рослини, деякі бактерії та гриби синтезують каротиноїди *de novo*, а тварини і людина одержують їх із їжею і, як правило, модифікують у процесі метаболізму [1–3]. Хромофорна група каротиноїдів представлена полієновим ланцюгом спряжених подвійних зв'язків, унаслідок чого вони поглинають світло в діапазоні 450–500 нм і мають жовте або оранжеве забарвлення. Каротиноїдні вуглеводні відомі під назвою каротинів (лікопін, β-каротин та його ізомери), а похідні з кисневмісними групами належать до групи ксантофілів (лютеїн, зеаксантин, астаксантин, кантаксантин). Ідентифіковано близько 600 різних каротиноїдів, із них тільки 10% мають про-А-вітамінну активність [4]. На цей час встановлено, що каротиноїди підвищують резистентність організму до мутагенезу і канцерогенезу [5], уповільнюють вікові дегенеративні зміни у тканинах [6–8], інгібують проліферацію злоякісних клітин [9], активують синтез цитокінів та інтерлейкінів [10], беруть участь у регуляції транскрипції генів [11], а також виявляють імуномодулюючу дію [12, 13]. Численні експериментальні результати свідчать про те, що каротиноїди є надзвичайно важливою ланкою регуляції вільнорадикальних процесів у клітинах. Каротиноїди — важливий компонент неензиматичної системи антиоксидантного захисту. На особливу увагу заслуговує каротиноїд астаксантин — антиоксидант, який у 10–12 разів ефективніший порівняно з β-каротином [14] і в 100–500 раз — порівняно із вітаміном Е [15]. Астаксантин у невеликих кількостях міститься у деяких видів риб, ракоподібних та водоростей. Дослідження вчених США, Японії та Канади свідчать про пряму залежність між рівнем споживання астаксантину і зниженням рівня онкологічних та серцево-судинних захворювань. Одним із джерел астаксантину є дріжджі *Phaffia rhodozyma*, які продукують нейроспорин (0,01%), лікопен (0,01%), γ-каротин (0,01%), β-каротин (2–2,5%), ехіненон (2–4%), гідроксіехіненон (3–4%), фоєнікоксантин (5–7%) та астаксантин (83–87%) [16, 17]. Дикі штами цих дріжджів не використовують у біотехнології, оскільки вони нагромаджують порівняно невисокі концентрації каротиноїдів.

Метою цієї роботи було отримання мутантних штамів дріжджів *P. rhodozyma* з різною продуктивністю за ознакою каротиногенезу та дослідження фракційного складу каротиноїдів у їхній біомасі.

## Матеріали і методи

У роботі використано штам «дикого» типу дріжджів *P. rhodozyma* NRRL Y-17268 з колекції мікроорганізмів Інституту біології тварин НААН України, люб'язно наданий професором C. P. Kurtzman (Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit, Peoria, Illinois, США), та отримані нами мутанти з різною пігментацією біомаси.

Біомасу дріжджів нарощували на роторному шейкері при 250 об/хв у колбах в рідкому середовищі складу (г/л): $(NH_4)_2SO_4$ — 0,9; $KH_2PO_4$ — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,15; дріжджовий екстракт — 2,0; глюкоза — 20,0; біотин — $1 \cdot 10^{-6}$.

Як мутагенний фактор у селекції дріжджів використовували ультрафіолетове проміння (УФП) та N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідин (НГ). Культуру дріжджів з експоненційної фази росту опромінювали бактерицидною лампою БУФ-30П на відстані 20 см протягом 5, 10, 15 і 20 хв, перемішуючи суспензію за допомогою магнітної мішалки. Після опромінення клітини висівали на чашки Петрі з агаризованим середовищем і культивували протягом 4 діб при температурі 21 °С. Усі маніпуляції з опроміненою культурою клітин проводили у темній кімнаті з червоним світлом. Декілька штамів дріжджів *P. rhodozyma* з кольоровою пігментацією колоній відбирали для подальших досліджень.

Для індукції мутацій у дріжджів хімічним мутагеном суспензію дводобової культури ($3 \times 10^9$ кл/мл) обробляли 1 мМ розчином НГ при температурі 20 °С за постійного перемішування протягом 25 хв. Дію мутагену зупиняли центрифугуванням з наступним відмиванням дистильованою водою. Суспензію оброблених клітин висівали на чашки Петрі із синтетичним агаризованим середовищем, до складу якого входив як селективний фактор менадіон у концентрації 120 мкМ, та вирощували у термостаті при 20–22 °С упродовж 7 діб.

Для відбору штамів із посиленим синтезом астаксантину використовували селективні середовища: $Cd^{2+}$-селективне (0,5 мМ $CdSO_4$) та 5-компонентне (склад солей: 0,47 мМ $CuSO_4$, 0,27 мМ $CdSO_4$, 3,5 мМ $ZnSO_4$, 0,96 мМ $Pb(NO_3)_2$, 0,85 мМ $CoSO_4$) [18].

Для визначення каротиноїдів у досліджуваних штамах дріжджів культуру вирощували протягом 5 діб при температурі 23 °С та аерації із заповненням колб на 10% . Біомасу визначали за оптичною густиною суспензії клітин при довжині хвилі 580 нм з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу клітин. Каротиноїди екстрагували сумішшю органічних розчинників гексан–етилацетат у співвідношенні 1:1 після попередньої обробки клітин диметилсульфоксидом (ДМСО) [19]. Клітини осаджували із культури дріжджів (1,5 мл) центрифугуванням і двічі відмивали дистильованою водою. Залишки вологи усували фільтрувальним папером. До клітин додавали 1–2 мл ДМСО, попередньо підігрітого до 55 °С, ретельно струшували. Після охолодження розчину додавали 5 мл розчиника (гексан–етилацетат) та відбирали верхню органічну фазу, що містить каротиноїди. Для чіткого розділення фаз додавали 0,1–0,5 мл фосфатного буфера (pH 7,0). Максимуми поглинання екстрактів каротиноїдів реєстрували у видимій області спектра (350–600 нм) на спектрофотометрі Shimadzu. Розрахунок концентрації каротиноїдів здійснювали за коефіцієнтом екстинкції ($E^{1\%}$) для астаксантину в суміші розчинників гексан–етилацетат (1:1), який становить 2,15 при довжині хвилі 480 нм (кювета 1 см).

Дослідження складу каротиноїдів виконували за допомогою тонкошарової хроматографії (ТШХ) на аналітичних пластинках Fluka UV-254 (Німеччина) у системі розчинників ацетон–петролейний ефір (1:4) [20], окремі фракції елюювали етанолом з метою ідентифікації отриманих сполук.

Усі реактиви, окрім попередньо зазначених, — вітчизняного виробництва.

## Результати та обговорення

На першому етапі досліджень нами було показано, що дріжджі *P. rhodozyma* дикого типу NRRL Y-17268 чутливі до дії УФ-променів, і виживання клітин знижується зі збільшенням тривалості опромінення (рис. 1).

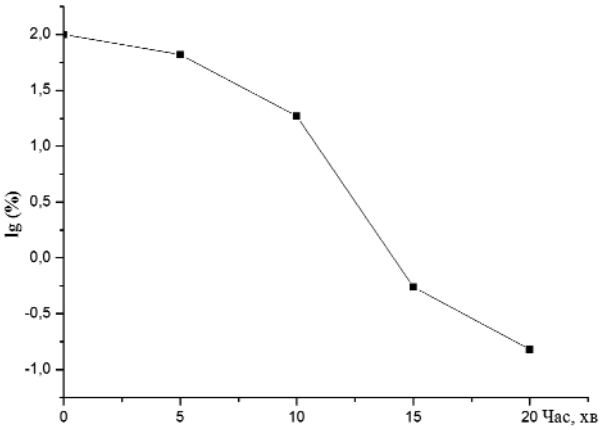



*Рис. 1.* **Крива виживання дикого штаму дріжджів *P rhodozyma* NRRL Y-17268 після опромінення УФ-лампою**

З рис. 1 видно, що під час опромінення дріжджів *P. rhodozyma* протягом 15 та 20 хв виживання клітин — 0,55 і 0,15% відповідно. Практично кожна доза УФ-опромінення спричиняла численні мутації, які виявлялися візуально (безбарвні, кремові, жовті, оранжеві, червоні, коричневі пігментовані колонії). Найбільше було колоній з порушеним синтезом каротиноїдів (штами з кремовою пігментацією клітин та безбарвні), значно менше штамів з жовто-оранжевою гамою, а штами червонішого за «дикий тип» кольору траплялися досить рідко. Загалом процес мутагенезу в каротиносинтезуючих дріжджів генерує три типи мутантів: 1) штами, здатні акумулювати бета-каротин (мутація порушує етап перетворення бета-каротину на астаксантин); 2) безбарвні штами, які нагромаджують фітоєн (у даному разі мутація на рівні генів, які кодують дегідрогеназу фітоєну); 3) штами з посиленим синтезом астаксантину [21].

На наступному етапі селекції застосовували мутаген хімічної природи НГ та селективний фактор середовища — менадіон. Відомо, що каротиноїди беруть участь в антиоксидантному захисті клітин, і тому було використано менадіон з метою посилення утворення активних форм кисню, тобто очікувалося, що клітини з підвищеним вмістом каротиноїдів матимуть більшу здатність до виживання в такому середовищі. У цій серії досліджень також отримано мутантні штами дріжджів *P. rhodozyma* з різним забарвленням колоній, що свідчить про зміну складу каротиноїдів порівняно з диким типом (рис. 2).

Спектральний аналіз екстрактів каротиноїдів, отриманих із біомаси різних мутантних штамів дріжджів *P. rhodozyma*, подано графічно (рис. 3).

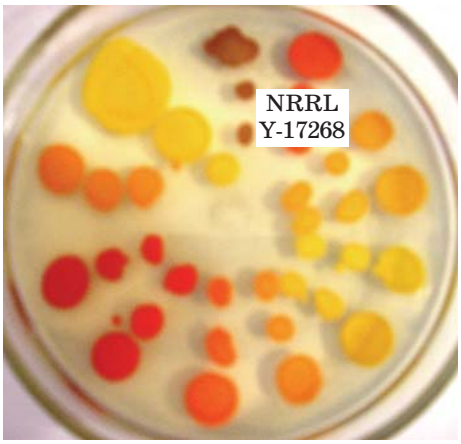



*Рис. 2.* **Колонії мутантних штамів дріжджів *P. rhodozyma* з різною пігментацією**

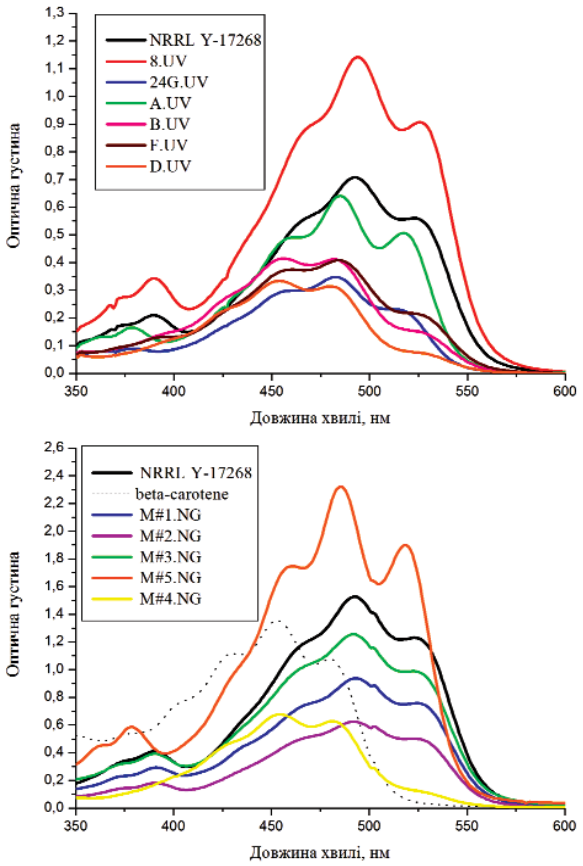



*Рис. 3.* **Спектри екстрактів каротиноїдів у гексан–етилацетаті (1:1), отриманих з біомаси мутантних штамів дріжджів *P. rhodozyma* в результаті УФ-опромінення (зверху) та з НГ-мутантних штамів (знизу)**

Штами A.UV, F.UV та 24G.UV мають зміщені максимуми поглинання світла у короткохвильову область щодо дикого штаму (подібно до штаму M#5NG), тобто максимальна оптична густина екстрактів спостерігається при 485 нм, 484 нм та 482,5 нм, відповідно. Можливо, домінуючим каротиноїдом у цих штамів може бути β-криптоксантин, неполярний каротиноїд, ідентифікований у кількох стабільних кольорових мутантів [22]. Зміщення максимумів поглинання екстрактів суміші каротиноїдів може бути наслідком різного співвідношення пігментів. Мутантні штами B.UV та D.UV продукують β-каротин як домінуючий каротиноїд у клітинах біомаси з жовтою пігментацією колоній. Крім того, в результаті УФ-опромінення було отримано штам з посиленим синтезом астаксантину, причому максимум поглинання екстракту спостерігався при 494 нм.

У НГ-індукованих мутантних штамів M#1NG, M#2NG, M#3NG домінуючим каротиноїдом є астаксантин, оскільки максимуми поглинання для екстрактів цих

штамів становлять 493, 492,2 та 492 нм, відповідно, тоді як у дикого штаму NRRL Y-17268 — 492,5 нм. Штам M#4NG належить до каротинпродукуючих дріжджів, тому що максимальна оптична густина екстракту спостерігається при 454,5 нм, а максимум поглинання екстракту β-каротину (Sigma, США) у суміші розчинників гексан–етилацетат (1:1) — при 452,6 нм. Мутантний штам M#5NG з оранжевою пігментацією колоній продукує каротиноїди, які, ймовірно, є проміжними сполуками у процесі біосинтезу від каротину до астаксантину (максимум поглинання екстракту каротиноїдів — 484,8 нм).

Ростові властивості та забарвлення біомаси виділених штамів дріжджів наведено в табл. 1.

*Таблиця 1.* **Характеристика мутантних штамів дріжджів *P. rhodozyma***

| Штам | Колір біомаси | Біомаса, г/л | Біохімічна група (за каротиноїдами) |
|---|---|---|---|
| NRRL Y-17268 | Рожевий | 8,8 | Астаксантин |
| A. UV | Кораловий | 9,0 | Невизначений |
| D. UV | Жовтуватий | 8,3 | Каротин |
| G. UV | Безбарвний | 7,6 | Можливо, фітоєн |
| 24G. UV | Оранжевий | 7,8 | Невизначений |
| F. UV | Жовто-оранжевий | 8,3 | Каротин |
| 8. UV | Червоно-рожевий | 7,6 | Астаксантин |
| NRRL Y-17268 | Рожевий | 9,3 | Астаксантин |
| M #1. NG | Брудно-рожевий | 4,2 | Астаксантин |
| M #2. NG | Темно-коричневий | 2,0 | Астаксантин |
| M #3. NG | Коричневий | 3,2 | Астаксантин |
| M #4. NG | Жовтий | 9,4 | Каротин |
| M #5. NG | Оранжевий | 9,0 | Невизначений |

У наступних дослідженнях було проведено ступінчасту позитивну селекцію з використанням селективних середовищ, що містили солі важких металів, які також індукують у клітинах утворення активних форм кисню [23–26], і отримано кілька штамів з підвищеним рівнем біосинтезу каротиноїдів.

З мутантного штаму 8.UV, після повторного УФ-опромінення отримано штам 21091, з якого під дією НГ було одержано кілька похідних мутантів із посиленим забарвленням колоній: KNG1 (з контрольного середовища), Cd#7 (із Cd-селективного середовища) та штам 5.1.26 (з 5-компонентного середовища). Спектральні характеристики екстрактів підтверджують домінування астаксантину в біомасі мутантних штамів з червоною пігментацією колоній (рис. 4).

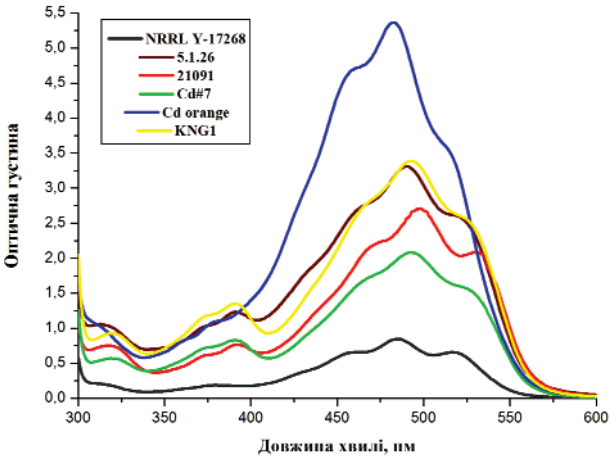



*Рис. 4.* **Спектри екстрактів каротиноїдів (у гексані), отриманих з біомаси мутантних штамів дріжджів *P. rhodozyma* з посиленим синтезом астаксантину**

Штам Cd orange з оранжевим забарвленням біомаси, отриманий на Cd-селективному середовищі, має характерний пік при 482,5 нм.

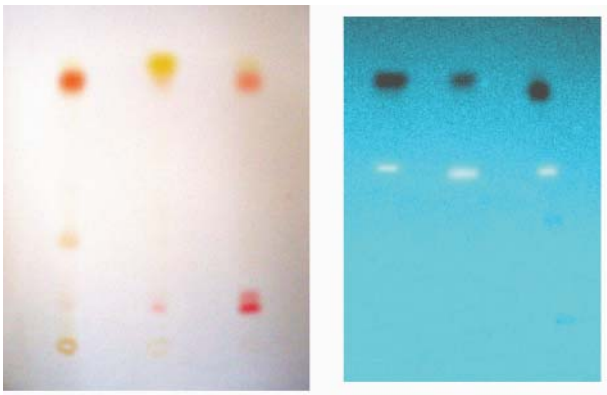
Каротинпродукуючі характеристики штамів з посиленим синтезом астаксантину наведено в табл. 2.

*Таблиця 2.* **Каротиногенез та продуктивність штамів з посиленим синтезом астаксантину після культивування протягом 120 год**

| Штам | Біомаса, г/л | Вміст каротиноїдів, мкг/г с.м. | Продуктивність, г/л |
|---|---|---|---|
| NRRL Y-17268 | 7,5±0,7 | 290±27 | 2,2±0,4 |
| 21091 | 7,1±0,2 | 812±27 | 5,8±0,3 |
| Cd#7 | 6,4±0,5 | 727±10 | 4,7±0,4 |
| 5.1.26 | 6,1±0,1 | 927±22 | 5,7±0,2 |
| KNG1 | 6,2±0,3 | 947±31 | 5,9±0,5 |

Отримані штами з посиленим синтезом астаксантину продукують більше каротиноїдів, ніж дикий тип, — у 2,5 раза для Cd #7 та 3,3 раза — у KNG1.

Гексан-етилацетатні екстракти каротиноїдів аналізували методом ТШХ на хроматографічних пластинках Fluka UV-254 в системі ацетон–петролейний ефір (1:4) (рис. 5).



*а* *б*

*Рис. 5.* **Хроматограма каротиноїдів, розділених у системі розчинників ацетон–петролейний ефір (1:4):**
*а* — для штамів Cd orange, F.UV та 21091 (зліва направо) у видимому світлі; *б* — при УФ-світлі для штамів M #4.NG, D.UV та A.UV

У деяких випадках одержані пігментні смуги на хроматограмах були недостатньо яскравими через низьку концентрацію каротиноїдів. Після хроматографічного розділення сорбент збирали і проводили елюцію пігментів гексаном та етанолом. У неполярному розчиннику (гексані) окремі фракції каротиноїдів практично не розчинялися, тимчасом як у полярному (етанолі) елюція відбувалася добре. Значна розчинність досліджуваних пігментів у спиртах свідчить про те, що їхні молекули переважно полярні, тобто є ксантофілами.

Одним із тестів для характеристики пігментів, який дозволяє визначити можливу належність каротиноїдів до різних класів, є значення $R_f$ (табл. 3). Склад каротиноїдів у біомасі дріжджів з різною пігментацією колоній ідентифіковано за показниками $R_f$ [20, 27] та спектральними характеристиками [2, 28, 29].

Застосовуючи спектрофотометричний аналіз, ми отримали спектри поглинання пігментних смуг після елюювання етанолом з типовою для каротиноїдів формою (рис. 6).

Згідно з даними літератури [28, 29] каротиноїди мають такі піки поглинання: фітоєн — 297, 286, 276 нм; зеаксантин — 450нм, ζ-каротин — 425, 399, 377 нм; β-каротин-5,8-епоксид — 452, 428, 407 нм. Незначні відхилення спектральних піків можуть бути наслідком ізомеризації каротиноїдів. Окрім того, виділені сполуки надзвичайно чутливі до світла, температурних коливань та впливу кисню повітря, оскільки система спряжених подвійних зв'язків піддається окиснювальному знебарвленню [2].

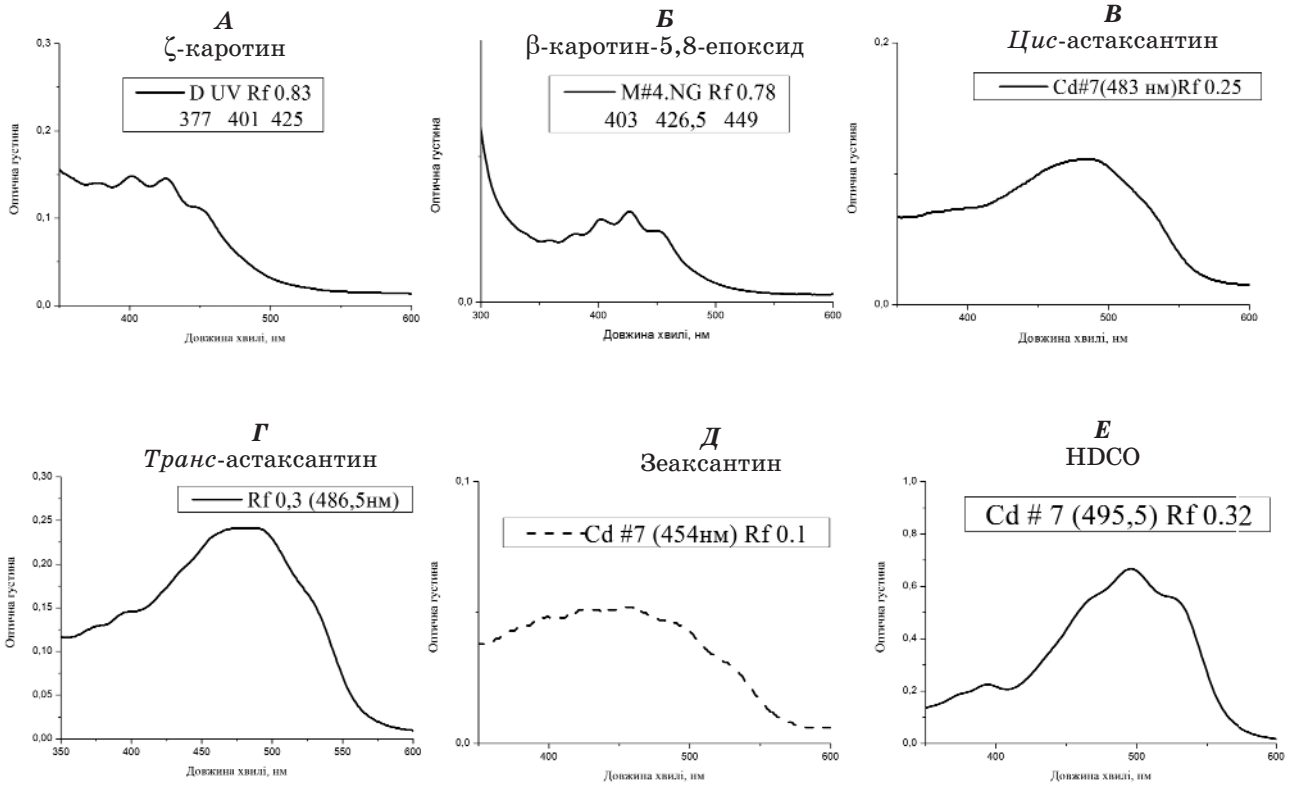



*Рис. 6.* **Спектри досліджуваних сполук в етанолі**

*Таблиця 3.* **Значення $R_f$ каротиноїдів, екстрагованих з біомаси мутантних штамів дріжджів *P. rhodozyma***

| Штам | Об'єм нанесеного екстракту, мкл | $R_f$ | Ідентифікація каротиноїду | Характеристика пігментних смуг |
|---|---|---|---|---|
| NRRL Y-17268 | 20,0 | 0,25<br>0,3<br>0,49<br>0,78 | *Цис*-астаксантин<br>*Транс*-астаксантин<br>Фітоєн<br>Каротин-5,8-епоксид | Червона, домінуюча<br>Блідо-рожева<br>Світиться в УФ<br>Оранжева |
| A.UV | 20,0 | 0,45<br>0,49<br>0,81 | Фоєнікоксантин<br>Фітоєн<br>α-зеакаротин | Червонувата<br>Світиться в УФ<br>Оранжева, домінуюча |
| D.UV | 35,0 | 0,49<br>0,62<br>0,83 | Фітоєн<br>HDCO<br>ζ-каротин | Світиться в УФ<br>Червонувата, швидко зникає<br>Жовта, домінуюча |
| F.UV | 20,0 | 0,25<br>0,49<br>0,76 | *Цис*-астаксантин<br>Фітоєн<br>Каротин | Червонувата<br>Світиться в УФ<br>Жовта, домінуюча |
| M #4. NG | 20,0 | 0,23<br>0,49<br>0,78 | Астаксантин<br>Фітоєн<br>Каротин-5,8-епоксид | Червонувата, ледь помітна<br>Світиться в УФ<br>Жовта, домінуюча |
| M #5. NG | 20,0 | 0,3<br>0,49<br>0,54<br>0,58<br>0,72 | *Транс*-астаксантин<br>Фітоєн<br>Криптоксантин<br>Кантаксантин<br>Ехіненон | Блідо-рожева<br>Світиться в УФ<br>Оранжева, домінуюча<br>Червоно-рожева, зникаюча<br>Жовта |
| 8.UV | 20,0 | 0,25<br>0,49 | *Цис*-астаксантин<br>Фітоєн | Червона, домінуюча<br>Світиться в УФ |
| 24G.UV | 20,0 | 0,49<br>0,83 | Фітоєн<br>ζ-каротин | Світиться в УФ<br>Оранжева, домінуюча |
| 21091 | 20,0 | 0,25<br>0,31<br>0,49<br>0,69 | *Цис*-астаксантин<br>*Транс*-астаксантин<br>Фітоєн<br>Неідентифікований | Червона, домінуюча<br>Блідо-рожева<br>Світиться в УФ<br>Оранжева |
| Cd#7 | 50,0 | 0,1<br>0,31<br>0,49<br>0,62 | Зеаксантин<br>*Транс*-астаксантин<br>Фітоєн<br>HDCO | Червона, зникаюча<br>Червонувата<br>Світиться в УФ<br>Фіолетова в УФ |
| Cd orange | 50,0 | 0,25<br>0,31<br>0,49<br>0,58<br>0,78 | *Цис*-астаксантин<br>*Транс*-астаксантин<br>Фітоєн<br>Кантаксантин<br>Каротин-5,8-епоксид | Червона<br>Червонувата (фіолетова в УФ)<br>Світиться в УФ<br>Рожева, зникаюча<br>Жовта |

*Примітка*. HDCO (3-гідрокси-3′, 4′-дигідро-β,ψ-каротен-4-он) [29].

Усі досліджувані нами штами продукують безбарвну сполуку з $R_f$ 0,49, яка флуоресціює за дії УФ. Під час дослідження спектральних характеристик встановлено, що максимуми поглинання цієї сполуки подібні до наведених у літературі даних для фітоєну (результати не подано). Фітоєн — попередник у синтезі великої кількості каротиноїдів, які в основному є забарвленими сполуками.

Відома класифікація мутантних штамів дріжджів *P. rhodozyma* [30], за якою виділяють три групи β-каротин-акумулюючих штамів, а саме: β-каротин-домінуючі, β-каротин-астаксантин-продукуючі та β-каротин зі слідовим вмістом проміжних сполук біосинтезу астаксантину. В наших дослідженнях практично всі штами незалежно від методу селекції можна віднести до двох останніх груп запропонованої градації, крім штаму 8UV, який продукує в основному астаксантин та фітоєн.

Таким чином, на основі селекції з використанням селективних факторів отримано групу мутантів дріжджів *P. rhodozyma*, які

синтезують *цис*-астаксантин, *транс*-астаксантин, фоєнікоксантин, β-каротин, ζ-каротин, фітоєн та зеаксантин. Найпродуктивніші мутанти утворюють 900–950 мкг каротиноїдів на 1 г сухої біомаси. Основну частину каротиноїдів у біомасі цих штамів становить астаксантин.

Автори висловлюють подяку к. б. н. Смутку О. В. з відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАНУ за допомогу в проведенні спектральних досліджень.

## ЛІТЕРАТУРА


1. *Влізло В. В., Куртяк Б. М., Янович В. Г.* Біохімічні основи нормування вітамінного живлення корів 1. Жиророзчинні вітаміни // Біологія тварин. — 2007. — Т. 7, № 1–2. — С. 25–42.
2. *Бриттон Г.* Биохимия природных пигментов. — М.: Мир, 1986. — 442 с.
3. *Куртяк Б. М.* , *Янович В. Г.* Жиророзчинні вітаміни у ветеринарній медицині і тваринництві. — Львів: Тріада плюс, 2004. — 426 с.
4. *Olson J. A.* Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in humans // Pure &Appl. Chem. — 1994. — V. 66, N 5. — P. 1011–1016.
5. *Bianchi L., Tateo F., Pizzala R.* Carotenoids reduce the chromosomal damage induced by bleomycin in human cultured lymphocytes // Anticancer Res. — 1993. — V. 13, N 4. — P. 1007–1010.
6. *Wang J. Y., Wen L. L., Huang Y. N.* Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of glia-mediated inflammation // Curr. Pharm. Des. — 2006. — V. 12, N 27. — P. 3521–3533.
7. *Gerster H.* Review: antioxidant protection of the ageing macula // Age Ageing . — 1991. — V. 20, N 1. — P. 60–69.
8. *Gross M. D., Snowdon D. A.* Plasma lycopene and longevity: Findings from the Nun Study // FASEB J. –2001. — V. 15, N 4. — P. A400.
9. *Jyonouchi H., Sun S., Iijima K.* Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action // Nutr. Cancer. — 2000. — V. 36, N 1. — P. 59–65.
10. *Kowluru R. A., Menon N. B., Gierhart D. L.* Beneficial effect of zeaxanthin on retinal metabolic abnormalities in diabetic rats // Investigative ophthalmology and visual science. — 2008. — V. 49, N 4. — P. 1645–1651.
11. *Bertram J. S.* Carotenoids and gene regulation // Nutr. Rev. — 1999. — V. 57, N 6. — P. 182–191.
12. *Jyonouchi H., Zhang L., Gross M.* Immunomodulating actions of carotenoids: Enhancement of *in vivo* and *in vitro* antibody production to T-dependent antigens // Nutr. Cancer. — 1994. — V. 21, N 1. — P. 47–58.
13. *Jyonouchi H., Hill R. J., Tomita Y.* Studies of immunomodulating actions of carotenoids. I. Effects of β-carotene and astaxanthin on murine lymphocyte functions and cell surface marker expression in in vitro culture system // Ibid. — 1991. — V. 16, N 1. — P. 93–105.
14. *Miki W.* Biological functions and activities of animal carotenoids // Pure & Appl. Chem. — 1991. — V. 63. — P. 141–146.
15. *Fassett R. G., Healy H., Driver R. et al.* Astaxanthin vs placebo on arterial stiffness, oxidative stress and inflammation in renal transplant patients (Xanthin): a randomized controlled trial // BMC Nephrology. — 2008. — V. 9, N 17. — P. 1–8.
16. *Andrewes A. G., Phaff, Starr M. P.* Carotenoids of *Phaffia rhodozyma* , a red-pigmented fermenting yeast // Phytochemistry. — 1976. — V. 15. — P. 1003–1007.
17. *Andrewes A. G., Starr M. P.* (3R, 3'R)-Astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma* // Phytochemistry. — 1976. — V. 15. — P. 1009–1011.
18. *Іутинська Г. О., Петруша З. В., Васильєва Т. В.* Токсичність і мутагенність важких металів — забруднювачів грунту // Совр. пробл. токсикол. — 2000. — № 2. — С. 53–56.
19. *Sedmak J. J., Weerasinghe D. K., Jolly S. O.* Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* // Biotechnol. Technol. — 1990. — V. 4. — P. 107–112.
20. *An G. H., Schuman D. B., Johnson E. A.* Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content // Applied Environ. Microbiol. — 1989. — V. 55. — P. 116–124.
21. *Stachowiak B., Czarnecki Z. Phaffia rhodozyma* yeasts as a potential source of a natural astaxanthin // Żywnosć. Nauka. Technologia. Jakosć. — 2006. — V. 2, N 47. — P. 17–28.
22. *Blasko A., Belagyi J., Dergez T. et al.* Effect of polar and non-polar carotenoids on *Xanthophyllomyces dendrorhous* membranes by EPR // Eur. Biophys. J. — 2008. — P. 1–8.
23. *Bhosale P.* Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2004. — V. 63. — P. 351–361.

24. *Pinto E., Sigaud-kutner T. C. S., Leitao M. A. S.* Heavy metal-induced oxidative stress in algae // J. Phycol. — 2003. — V. 39, Iss. 6. — P.1008–1018.
25. *Li Q., Harvey L. M., McNeil B.* Oxidative stress in industrial fungi // Critical Reviews in Biotechnology. — 2009.– V. 29, N 3. — P. 199–213.
26. *Frengova G. I., Beshkova D. M.* Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeast of biotechnological importance // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2009. — V. 36. — P. 163–180.
27. *Asker D., Awad T., Ohta Y.* Lipids of *Haloferax alexandrinus* Strain TM$^T$: an Extremely Halophilic Canthaxanthin-Producing Archaeon // J. of Bioscience and Bioengineering. — 2002. — V. 93, N 1. — P. 37–43.
28. *Rodrigues-Amaya D. B.* A guide to carotenoid analysis in foods. — Campinas, SP, Brazil. — USA. — 2001. — P. 71.
29. *Vazques M.* Carotenoid profiles of *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains // Food technol. biotechnol. — 2001. — V. 39, N 2. — P. 123–128.
30. *Rubinstein L., Altamirano A., Ducrey Santopietro L.* Isolation and characterization of *Phaffia rhodozyma* mutants // Folia Microbiol. — 1998. — V. 43, N 6. — P. 626–630.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА КАРОТИНОИДОВ У МУТАНТОВ ДРОЖЖЕЙ *Phaffia rhodozyma (Xanthophyllomyces dendrorhous)*

*С. В. Гураль*[1]
*Г. В. Колисныk*[1]
*Д. О. Клымышин*[1]
*М. В. Гончар*[2, 3]

[1]Институт биологии животных НААН Украины, Львов
[2]Інститут биологии клетки НАН Украины, Львов
[3]Жешувский университет, факультет биотехнологии, Кольбушова, Польша

*E-mail: g_svitlana@ukr.net*

Под воздействием ультрафиолетовых лучей и нитрозогуанидина от штамма дрожжей *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268 получена группа мутантов, способных образовывать пигменты желтого, оранжевого, коричневого и розового цвета. Пигменты мутантов экстрагированы и очищены с помощью тонкослойной хроматографии, определены их хроматографическая подвижность и спектры поглощения света. В биомассе полученных мутантов идентифицированы *цис*-астаксантин, *транс*-астаксантин, феникоксантин, β-каротин, ζ-каротин, фитоен и зеаксантин. Самые продуктивные мутанты образуют около 940 мкг каротиноидов на 1 г сухой биомассы, среди которых основную часть составляет астаксантин.

***Ключевые слова:*** дрожжи *Phaffia rhodozyma*, каротиноиды, астаксантин, менадион, нитрозогуанидин.

## INVESTIGATION OF CAROTENOIDS' COMPOSITION IN THE YEAST MUTANTS *Phaffia rhodozyma (Xanthophyllomyces dendrorhous)*

*S. V. Gural*[1]
*G. V. Kolysnyk*[1]
*D. O. Klymyshyn*[1]
*M. V. Gonchar*[2, 3]

[1]Institute of Animal Biology of National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine, Lviv
[2]Institute of Cell Biology of National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv
[3]Rzeszow University, Branch Campus of the Faculty of Biotechnology, Kolbuszowa, Poland

*E-mail: g_svitlana@ukr.net*

Using ultraviolet rays and nitrosoguanidine, from the wild strain of the yeast *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268, the mutants were isolated that were able to produce pigments of yellow, orange, brown, and pink color. The pigments were extracted and purified by thin layer chromatography, and characterized by their chromathographic mobility and absorption spectra. *Cis*-astaxanthin, *trans*-astaxanthin, phoenicoxanthin, β-carotene, ζ-carotene, phytoene and zeaxanthin from biomass of the isolated mutants were identified. The most efficient strains produced about 940 μg carotenoids per gram of dried biomass, among which astaxanthin gave the main part of them.

***Key words:*** yeast *Phaffia rhodozyma*, carotenoids, astaxanthin, menadione, nitrosoguanidine.