



MAKALE HAKKINDA

Geliş : Eylül 2012

Kabul: Kasım 2012

PHAFFIA RHODOZYMA (KIRMIZI MAYA) DAN ASTAXANTHİN ÜRETİMİ VE KULLANIM ALANLARI

ASTAXANTHİN PRODUCTION FROM PHAFFIA RHODOZYMA AND USES AREA

Rezan Alkan^a

ÖZ

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) mayalardan *Phaffia rhodozyma*, alglerden *Haemotococcus pluvialis* gibi mikroorganizmalar, flamingo ve kırmızı balıkçıl kuşları, alabalık ve somon balıkları ile istakoz ve karides gibi bazı kabuklu canlılarda bulunan ve tabiatta yaygın olarak dağılım gösteren bir karotenoiddir. Alabalık ve somon çiftliklerinde kullanılmaktadır. Bu derlemede, *Phaffia rhodozyma*' dan astaxanthin ekstraksiyon teknikleri ve hayvanlar üzerindeki etkileri özetlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Astaxanthin, *Phaffia rhodozyma*, Alabalık ve somon üretimi

ABSTRACT

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) is a carotenoid widely distributed in nature, found as the main pigment in some crustaceans (shrimp and lobster), fish (trout and salmon), birds (flamingo and scarlet ibis) and microorganisms (the yeast *Phaffia rhodozyma* and the algae *Haemotococcus pluvialis*). It is mainly used in the trout and salmon farming. In this review, astaxanthin extraction techniques from *Phaffia rhodozyma*, its effects on animals are summarized.

Keywords: Astaxanthin, *Phaffia rhodozyma*, Trout and salmon farming

GİRİŞ

Karotenoidler bitki, alg ve fotosentez yapan bakterilerde bulunan fotosentezde kritik bir rol oynayan yağda çözünen pigmentlerdir. Bazı fotosentez yapmayan bakteri, maya ve küflerde bulunan ışık ve oksijenin oluşturduğu zararlara karşı koruyucu etkide bulunan bileşiklerdir (Black ve Mathews-Roth, 1991; Conn vd., 1991; Kobayashi vd., 1997; Wang ve Li, 1997). Karotenoidlerin hayvanlarda A

vitamini kaynağı ve antioksidan etkisinin olduğu belirtilmiştir (Ong ve Tee, 1992; Britton, 1995; Miki, 1991). Hayvanlar karotenoidleri sentezleyemedikleri için yemlerine katılarak etlerine parlak renk vermek için kullanılır. Astaxanthin doğada yaygın olarak bulunan tek karotenoiddir. Hayvanlar aleminden flamingo ve kırmızı balıkçılların tüylerinde, istakoz, yengeç ve karideslerde, alabalık ve somon balıklarının etlerinin renklenmesine neden olan karotenoid

^aYrd.Doç.Dr., Kocaeli Üniversitesi, rezanalkan@kocaeli.edu.tr

grubuna ait olan ana pigmentlerden birisidir (Johnson, 1991; Verdoes vd., 1999). Renklendirici etkisinin yanı sıra kanserin önlenmesi, bağışıklık artırıcı ve serbest radikalleri tutucu özelliği de vardır (Fraser vd., 1997; Kurashige vd., 1990; Lawlor ve O'Brien, 1995; Guerin vd., 2003; Palozza ve Krinsky, 1992; Bertram ve Vine, 2005). Bütün bu özellikleri astaxanthinin gıda endüstrisinde yüksek Pazar değerine sahip olmasını sağlamaktadır. Astaxanthin deniz balıklarının renklendirilmesi için kimyasal olarak sentezlenerek hayvan yemlerine katılmaktadır. Sentetik olarak elde edilen bu pigmentin maliyeti yüksektir (Johnson, 1991) balık yemlerinin toplam maliyetinin %10 kadarını oluşturduğunu açıklamıştır. Amerikada tıp ve gıda bileşiminde katkı olarak kullanımına sentetik olduğu için izin verilmemektedir. Bundan dolayı doğal kaynakların kullanılmasına yönelik araştırmalarda hız kazanmıştır. Astaxanthin kaynağı olarak yeşil alglerden *Haematococcus pluvialis* ve *P. rhodozyma* en iyi mikroorganizmalar olarak gösterilmektedir. *P. rhodozyma* mayasında toplam karotenoid miktarı kuru madde bazında 500-2000 µg/g olarak tespit edilmiştir. Bu miktarın %45-95 kadarı astaxanthin olarak belirlenmiştir. Bu miktarın *Haematococcus pluvialis* te %0.2-2 arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu miktar maya türünde daha az bulunmasına rağmen mayaların hızlı üremesi nedeniyle mayaların daha iyi kaynak olabileceği gösterilmiştir (Johnson, 2003).

Tarihçesi

P. rhodozyma ilk kez maya ekolojisi çalışmalarında öncü olan Herman Phaff tarafından 1960 yılında izole edilmiştir. Alaskanın dağlık bölgelerinde yaygın olarak bulunan *Betula* ağacının salgısından izole edilmiştir. İlk izole edildiğinde portakal-kırmızı renkli olduğu için ve dağlık bölgeden izole edildiği için de *Rhodozyma montanae* adı

verilmiştir. Bu mayanın en ilgi çekici özelliği içerdiği karotenoid pigmentlerinden dolayı besi yerinde kırmızı renkli koloniler oluşturması glukoz, maltoz ve sakarozu hızlı bir şekilde tüketme özelliği olmuştur. Bu mayanın tanımlanması 1976 yılında Miller tarafından yapılmıştır. Hücre duvarı özellikleri, pigment oluşturması, morfolojisi ve metabolik özellikleri yönünden *Basidiomycetes* grubundaki mikroorganizmaların özelliklerine benzerlik göstermiştir. Başlangıçta bu maya sınırlı coğrafik alanlardan izole edilmiştir. İlerleyen zamanlarda Rusya, Şili, Finlandiya ve Amerika dan da biyolojik özelliklerinde farklar olan izolatlar elde edilmiştir. *P. rhodozyma'nın* özelliklerine en yakın olanı *Xantophyllomyces dendorhous* olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Bu mayalar astaxanthin adı verilen karotenoidleri içerdiklerinden biyoteknolojik olarak dikkat çekmiştir. Bu bileşiğin reaktif oksijen çeşitlerinin zararlı etkilerini önlediği yani hücreleri bu etkilere karşı koruduğu açıklanmıştır (Johnson, 2003).

Hücre duvarının özellikleri, tomurcuk oluşumu, metabolik özellikleri, morfolojik yapısı gibi özellikler *Basidiomycetes* orijinli olduğunu göstermiştir. *Phaffia rhodozyma'da* astaxanthin sitoplazma membranında sentezlenmektedir. Bu maya türünün sağlam hücre duvarının olması hayvanlar tarafından etkili bir şekilde adsorbe edilmesine engel olmaktadır (Johnson, 1991; Ytrestoyl vd., 2005).

ÇALIŞMA VE YÖNTEM

Phaffia rhodozyma' dan astaxanthin ekstraksiyonu

Mayalar biyolojik, fiziksel ve kimyasal olarak parçalanabilmektedir. Sıcak DMSO (Di metil sülfoksit) *P. rhodozyma* dan astaxanthinin ekstraksiyonu için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Sedmak vd., 1990; Johnson,

1991). Fakat bu maddenin gıdalarda kalıntı bırakması nedeniyle uygun olmadığı da belirtilmektedir (Gentles ve Haard, 1991; Johnson vd., 1977; 1980; Storebakken vd., 2004). Değirmen ve yüksek basınçlı homojenizasyon işleminin ekstraksiyon için yetersiz kaldığı, bu yöntemlerle %80 den az pigment ekstrakte edildiği belirtilmiştir . Hücre duvarının alkali koşullara hassas olup, astaxanthinin astacen adı verilen bileşiğe dönüştüğü açıklanmıştır (Johnson, 1991). Ekstraksiyon işlemi asidik koşullarda gerçekleştirildiğinde de astaxanthinin parçalandığı tespit edilmiştir . Asit kullanılarak yapılan ekstraksiyon metodun da optimizasyon çalışmaları yapılmıştır (Huichen vd., 2007). Çalışmada astaxanthin ekstraksiyonu laktik, hidroklorik, asetik asit gibi asitlerle aseton, alkol ve kloroform gibi organik çözücüler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 5.55 ml/lit laktik asit, 20.25 ml /g maya, ekstraksiyon sıcaklığı 30°C ve süresi 3 dak olarak belirlendiğinde, astaxanthin miktarı 1516 µg/g olarak tespit edilmiştir. Bu metodun yüksek ekstraksiyon etkinliği ve özel cihaz gerektirmemesi nedeniyle avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Astaxanthin üretimi

P. rhodozyma dan elde edilen astaxanthin kullanımının dünya pazarlarında yaygınlaştırılması amacıyla, ucuz karbon kaynaklarının kullanılmasına yönelik araştırmalar yapılmaktadır. Bu amaçla, şeker kamışı melası (Haard,1988), mısır yan ürünleri (Hayman vd., 1995), bezelye hidroliz ürünleri (Martin vd., 1993), üzüm suyu (Meyer ve Du Preez, 1994a) ve hurma suları (Ramirez vd., 2000) kullanılmıştır.

Astaxanthin verimini arttırmak amacıyla astaxanthin verimine etki eden besin, pH ve sıcaklık gibi fiziksel faktörler üzerinde yapılan

farklı çalışmalar yayınlanmıştır (Johnson vd., 1979; Fang ve Cheng, 1993; Meyer vd., 1993). Fakat bu faktörler bağımsız olarak analiz edilememiştir. Astaxanthin üretimi istatistiksel yöntemlerle optimize edilebilmektedir (Box vd., 1978; Haaland, 1989). Fermentasyonu optimize etmek için besin maddeleri ve fiziksel koşulları belirlemek gerekmektedir. Çalışmada hurma sırasında üretilen mutant *P.rhodozyma* nın üretim koşullarını optimize edilmesine yönelik araştırma yapılmıştır (Ramirez vd., 2001).

Bu çalışmalarda en yüksek astaxanthin miktarı 19.7°C de 11.25 g/lit karbon 0.5 g/lit azot %5 aşu konsantrasyonunda, pH 6 da elde edilmiştir. Bu koşullarda hücrelerden %92 oranında astaxanthin elde edilmiştir.

Hayvanlar üzerindeki etkileri

Yüksek miktarda astaxanthin içeren *P. rhodozyma* ile beslenen çiftlikte yetişen somon balıklarında etin renklenmesinde olumlu etkilerinin olduğu belirtilmektedir (Andrewes vd., 1976; Johnson vd., 1977). Yumurta tavuklarında da yumurta sarısının renginin daha koyu kırmızı renkte olduğu belirtilmiştir (Akiba vd., 2000). Hücre duvarı parçalanmış ve parçalanmamış olan *P.rhodozyma* nın sofralık piliçlerin doku ve etlerinin renklenmesine olan etkileri incelenmiştir (Akiba vd., 2001). Çalışmada *P. rhodozyma* ile beslenen tavukların performansında bir değişiklik olmamasına rağmen hücre duvarı parçalanarak yem katkısı olarak kullanılan deneme grubunda etlerin renklenmesinin daha fazla olduğu açıklanmıştır.

SONUÇLAR

Son zamanlarda mikroorganizmalardan elde edilen doğal ürünler dikkat çekmektedir. Sentetik olan ürünler çok fazla tercih edilmemektedir. Bu doğal ürünlerden biri de

Astaxanthin olup *P. rhodozyma* mayasında mevcuttur. Literatür araştırmalarında en dikkat çeken nokta maya hücrelerinin hücre duvarlarının sağlam olması nedeniyle hayvanlar tarafından etkili bir şekilde parçalanmasını zorlaştırıcı etkide olmasıdır. Bu amaçla hücre duvarı parçalanmış ve parçalanmamış mayaların tavuklar üzerinde etlerin renklenmesine yönelik araştırmalarda hücre duvarının parçalanması et renklenmesini ve yumurta sarısının rengini arttırıcı yönde olduğu tespit edilmiştir. Bir ürünün daha ucuza mal edilmesinin en önemli noktası kullanılan hammaddelerin ucuz olmasından geçmektedir. Bu nedenle de ucuz hammaddeler denenerek yapılan çalışmalar sanayi koşullarında üretim için elzemdir.

KAYNAKLAR

- Akiba, Y., Sato, K., Takahashi, Y., Takahashi, A., Furuki, S., Konashi, H., Nishida, H., Tsunekawa, H., Hayasaka, Y., Nagao, H. 2000. Pigmentation of egg yolk with yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentration of astaxanthin in laying hens fed on a low-carotenoid diet. *Jpn. Poultry. Sci.* 37: 77-85.
- Akiba, Y., Sato, K., Takahashi, K., Matsushita, H., Komiyana, H., Tsunekawa, H., Nagao, H. 2001. Meat color modification in broiler chickens by feeding yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentrations of astaxanthin. *Poultry Science Association, Inc.* 154-161.
- Andrewes, A.G., Phaff, H.J., Starr, M.P. 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermentation yeast. *Phytochemistry*, 15:1003-1007.
- Bertram, J.S., Vine, A.L. 2005. Cancer prevention by retinoids and carotenoids: Independent action on a common target. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740 (2): 170-178.
- Black, H.S., Mathews –Roth, M.M.1991. Protective role of butylated hydroxytoluene and ceratin carotenoids in photocarcinogenesis. *Photochem. Photobiol*, 53(5): 707-716.
- Box, G.E., Hunter, W.G., Hunter, J.S. 1978. *Statistics for experimenters*. Wiley, New York, NY.
- Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb J*, 9(15):1551-1558.
- Conn, P.F., Schalch, W., Truscott, T.G. 1991. The singlet oxygen and carotenoid interaction. *J.Photochem. Photobiol, B.Biol*, 11(1):41-47.
- Fang, T.J., Cheng, Y.S. 1993. Improvement of astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 75: 466-469.
- Fraser, P.D., Miura, Y., Misawa, N. 1997. In vitro characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *J. Biochem*, 272 (10): 6128-6135.
- Gentles, A., Haard, N.F. 1991. Pigmentation of rainbow trout with enzyme-treated and spray dried *Phaffia rhodozyma*. *The progressive fish culturist*, 53(1):1-6.
- Guerin, M., Huntley, M.E., Olaizola, M. 2003. *Haematococcus astaxanthin*: application for human health and nutrition. *Trends Biotechnol*, 21(5): 210-216.
- Haaland, P.D. 1989. *Experimental design in biotechnology*. Marcel Dekker, New York, NY.
- Haard, N.F.1998. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. *Biotechnol. Lett*, 10, 609-614.
- Hayman, G.T., Mannarelli, B.M., Leathers, T.D. 1995. Production of carotenoids by *Phaffia*

rhodozyma grown on media composed of corn wet milling co products. J. Indus. Microbiol, 14: 389-395.

Huichen, N.I., Q.H., Ruan, H., Yang, Y., Li Li-JUN., Guang, W.U., Yang, H.U., Guo-qing, H.E. 2007. Studies on optimization of nitrogen source for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. J. Zhejiang Univ.Sci B 8(5): 365-370.

Johnson, E.A., Conklin, D.E., Lewis, M.J. 1977. The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. J. Fish Res. Board Can, 34: 2417-2421.

Johnson, E.A., Lewis, M.J. 1979. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. J. Gen. Microbiol. 115: 173-183.

Johnson, E.A., Villa, T.G., Lewis, M.J. 1980. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. Aquaculture, 20(2): 123-134.

Johnson, E.A. 1991. Astaxanthin from microbial sources. Crit. Rev. Biotechnol, 11 (4): 297-326.

Johnson, E.A. 2003. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. Int. Microbiol, 6(3): 169-174.

Kobayashi, M., Kakizono, T., Hishio, N., Nagai, S., Kurimura, Y., Tsuji, Y. 1997. Antioxidant role of astaxanthin in the green alga, *Haematococcus pluvialis*. Appl. Microbiol Biotech, 48(3): 351-356.

Kurashige, M., Okimasu, E., Inoue, M., Utsumi, K. 1990. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. Physiol. Chem. Phy. Med. NMR, 22(1): 27-38.

Lawlor, S.M., O'Brien, N.M. 1995. Astaxanthin: antioxidant effects in chicken embryo fibroblasts. Nutr. Res, 15(11): 1695-1704.

Martin, M.A., Acheampong, E., Patel, R.T. 1993. Production of astaxanthin by *Phaffia*

rhodozyma using peat hydrolysates as substrate. J. Chem. Tech. Biotechnol, 58: 223-230.

Meyer, P.S., Du Preez, J.C., Kilian, S.G. 1993. Selection and evaluation of astaxanthin overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. World J. Microbiol. Biotech. 9:514-520.

Meyer, P.S., Du Preez, J.C. 1994a. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. World. J. Microbiol. Biotech. 10: 178-183.

Miki, W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. Pure Appl. Chem, 63(1):141-146.

Miller, M.W., Yoneyama, M., Soneda, M. 1976. *Phaffia*, a new yeast genus in the Deutymycotina (Blastomycetes). Int J Syst.Bacteriol, 26:286-291.

Ong, A.S.H., Tee, E.S. 1992. Natural sources of carotenoids from plants and oils. Meth.Enzymol, 213: 142-167.

Palozza, P., Krinsky, N.I. 1992. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. Arch. Biochem. Biophys, 297(2): 291-295.

Ramirez, C.J., Nuñez, M.L., Valdivia, R. 2000. Increased astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant grown on date juice from *Yucca fillifera*. J. Indus. Microbiol. 24; 187-190.

Ramirez, J., Humberto, G., Gschaedler, A. 2001. Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology. Journal of Biotechnology. 88: 259-268.

Sedmak, J.J., Weerasinghe, D.K., Jolly, S.O. 1990. Extraction and quantification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. Biotechnol. Tech, 4(2):107-112.

Storebakken, T., Sorensen, M., Bjerkg, B., Harris, J., Monahan, P., Hiu, S. 2004. Stability of astaxanthin from red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous* during feed processing effects of enzymatic cell wall disruption and extrusion temperature. *Aquaculture*, 231(1/4): 489-500.

Verdoes, J.C., Misawa, N., Van ooyen, A.J.J.1999. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding photogene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol. Bioeng*, 63 (6): 750-756.

Wang, Q.Y., Li, Q.S. 1997. Natural carotenoids advancements in studies, producing and application. Press of China Pharmaceutical Technology, Beijing (In Chinese).

Ytreastoyl, T., Struksnaes, G., Koppe, W., Bjerkg, B. 2005. Effects of temperature and feed intake on astaxanthin digestibility and metabolism in Atlantic Salmon, *Salmo salar*. *Comp. Biochem, Phsiol. Part B. Biochem. Mol. Biol*, 142 (4): 445-455.