

МИКРОВОДОРОСЛИ КАК ПРОДУЦЕНТЫ ТОКОФЕРОЛОВ

В. М. МОКРОСНОП, Е. К. ЗОЛОТАРЕВА

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев

E-mail: membrana@ukr.net

Получено 16.12.2013

Микроводоросли способны накапливать значительные количества токоферолов (до 4 мг/г сухой массы). В отличие от растительных масел, количество α -токоферола в которых невелико, микроводоросли содержат до 97% этого токохроманола, что обеспечивает высокую биологическую активность витамина Е, извлекаемого из этих организмов. Приведены сведения о содержании токоферолов у эукариотических микроводорослей *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Euglena gracilis*, *Tetraselmis suecica*, *Diacronema vlkianum*, а также у цианобактерии *Spirulina platensis*. Накопление токоферолов у микроводорослей зависит от способа культивирования. Наибольшее количество токоферолов синтезируется в клетках *Euglena gracilis* при гетеротрофном выращивании. Такие технологические приемы, как двухстадийное культивирование, лимитирование питательной среды по некоторым биогенным элементам, введение экзогенных источников углерода, используются для повышения выхода α -токоферола у микроводорослей. В обзоре рассмотрена также стратегия генетической модификации растений, ведущая к повышению содержания активного витамина Е.

Ключевые слова: микроводоросли, α -токоферол, двухстадийное культивирование.

Соединения под общим названием «витамин Е» являются биологически активными жирорастворимыми токохроманолами, среди которых выделяют две группы — токоферолы и токотриенолы. Токоферолы имеют насыщенные боковые цепи, а токотриенолы — ненасыщенные, при этом каждая группа включает по четыре природных изоформы (α , β , γ и δ). В природе синтез витамина Е обеспечивают только фотосинтезирующие организмы — растения, эукариотические и прокариотические водоросли [1, 2].

Антиоксидантная функция витамина Е широко известна и достаточно изучена. В организме человека токоферол участвует в неэнзиматических антиоксидантных реакциях и обеспечивает защиту от активных форм кислорода. Учитывая химическую реактивность и действующие концентрации α -токоферола, можно утверждать, что он является важнейшим природным липофильным антиоксидантом *in vivo*. В плазме крови концентрация α -токоферола составляет 20,5–26,8 мкмоль/л, в то время как γ -токоферола — всего 1,5–3 мкмоль/л. Такое преобладание α -изоформы связывают с активностью α -токоферолтранспорти-

рующего протеина (α -ТТБ), избирательно облегчающего ее транспортировку [3]. Установлено, что антиоксидантная активность токоферолов *in vivo* зависит от уровня метилирования токохроманола и соответствует ряду α -Т > β -Т > γ -Т > δ -Т. Благодаря высокой внутримембранной подвижности наибольшую антиоксидантную активность имеют токотриенолы, однако их содержание в растительных продуктах, а следовательно, и роль в антиоксидантной защите животных организмов, существенно уступает токоферолам [3, 4].

Токоферолы встраиваются в мембраны клеток и их органелл, где могут обеспечивать максимальную защиту от свободных радикалов, окисляющих полиненасыщенные жирные кислоты и другие компоненты мембран. Предполагают, что витамин Е снижает риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний и злокачественных опухолей, участвует в предотвращении индуцированных светом патологий кожи, глаз, дегенеративных заболеваний, в частности атеросклероза [5].

Витамин Е используют в пищевой промышленности для защиты продуктов от окисления. В этом качестве пищевые добав-

ки (E307–E309), содержащие токоферолы, разрешены в Украине и Евросоюзе и применяются для защиты жиров от прогоркания и изменения цвета. Большая часть произведенного витамина E потребляется животными, тогда как нужды человека удовлетворяет главным образом витамин природного происхождения, составляющий всего около четверти общего производства [6].

На сегодняшний день α -токоферол получают путем химического синтеза и экстракции из растительных масел. Синтезируют витамин E из нефтепродуктов — изофитола и триметилгидрохинона. Широко используемая синтетическая форма *all-rac*- α -токоферол (*dl*- α -токоферол) состоит из смеси восьми стереоизомеров, где на природный стереоизомер *RRR*- α -токоферол приходится всего 12,5% [7]. Только 3 стереоизомера из 7 ненатуральных могут соответствовать активности *RRR*- α -токоферола, остальные 4 имеют сниженную активность и не узнаются α -ТТБ. Таким образом, природный α -токоферол по физическим свойствам несколько отличается от синтетического α -токоферола [5, 8].

Биологическая активность 1 мг природной формы *d*- α -токоферола соответствует 1,49 интернациональным единицам (ИЕ), в то время как биологическая активность такого же количества синтетического витамина E составляет 1 ИЕ. Таким образом, натуральный α -токоферол в ~1,5 раза активнее синтетического [9]. Несмотря на доминирование на рынке синтетических токоферолов, в последние десятилетия возрастает потребительский спрос на натуральные антиоксиданты из-за возможного вреда здоровью длительного употребления синтетических витаминов.

В натуральном витамине E, изолированном из растительных масел, преобладает

γ -токоферол, биологическая активность которого в 10 раз ниже, чем биологическая активность α -токоферола. Другие компоненты витамина E из растительных масел также уступают α -токоферолу по биологической активности: β -токоферол — в 2 раза, а α -токотриенол — в 3,3 раза [10–15].

Плоды масличных растений, таких как подсолнух, соя, рапс, масличная пальма, грецкий орех, арахис, а также проростки пшеницы содержат большие количества токохроманолов. В табл. 1 приведены данные об их содержании в некоторых растительных маслах.

Наиболее богаты α -токоферолом проростки пшеницы. Основными источниками природного коммерческого витамина E являются масла сои и подсолнечника [6, 15]. Причем, в рапсовом и кукурузном маслах доля α -токоферола не превышает 36%, а в соевом масле составляет лишь 14%. Из-за невысокого содержания α -токоферола общая активность витамина E, получаемого из этих источников, невелика [9, 16].

Содержание активного витамина E в культурных растениях удается повысить с помощью методов генной инженерии. Успешным оказался подход, основанный на регуляции экспрессии структурных генов, кодирующих основные ферменты синтеза токохроманолов. Увеличение активности накапливаемого витамина E в этом случае достигается за счет либо увеличения содержания всех изоформ токохроманолов, либо превращения их в α -токоферол [17, 18].

Обе стратегии были успешно применены для трансформации растений арабидопсиса, рапса и сои. Семена этих растений содержат в основном γ - и δ -токоферолы из-за сниженной активности γ -токоферолметилтрансферазы (VTE-4), которая превращает

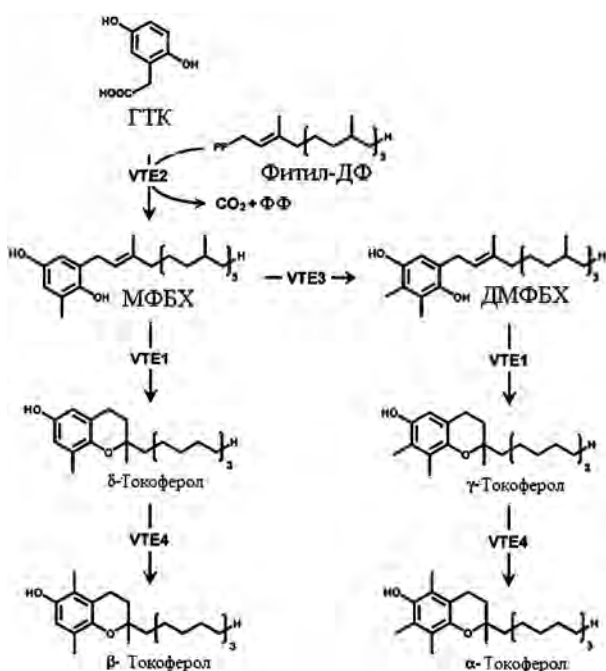
Таблица 1. Содержание токохроманолов (мг/100 г) в маслах культурных растений

Масло растения	α -Т	β -Т	γ -Т	δ -Т	α -ТЗ	β -ТЗ	γ -ТЗ	δ -ТЗ	Источники
Проростки пшеницы	127–192	65	18	0	2,5	8,2	0	0,24	[11, 12]
Подсолнух	59–61	1,7–2,4	1,1–1,4	0,27–2	0	0	0	0	[11, 13, 14]
Соя	11–7,5	3–3,4	61–74	26–36	0	0	0	0	[12, 13, 14, 15]
Рапс	17–26	0	36–43	1–4	0	0	0	0	[12, 13, 15]
Кукуруза	18	1,1	44	2,2	0,94	0	0	0,26	[11]

Примечание: Т — токоферол, ТЗ — токотриенол.

γ - и δ -токоферолы в α - и β -токоферолы соответственно (рисунок). Трансформация растений арабидопсиса, направленная на повышение экспрессии γ -токоферолметилтрансферазы в семенах, привела к превращению $> 95\%$ γ -токоферолов в α -изоформу, а небольшого пула δ -токоферолов — в β -токоферол, при этом общий уровень токохроманолов остался неизменным. Таким образом, активность витамина Е, накапливаемого в семенах арабидопсиса, увеличилась в 9 раз [19]. Сверхэкспрессия гена, кодирующего 2-метил-6-фитилбензохинол метилтрансферазу (VTE-3) у растений *Arabidopsis*, снизила содержание δ - и β -изоформ токоферолов с пропорциональным увеличением количества γ - и α -изоформ. Коммерчески важные масличные культуры, такие как рапс, соя и кукуруза, со сниженным соотношением α/γ -изоформ и невысоким общим количеством активного витамина Е могут быть модифицированы подобным образом [19].

В результате генной трансформации сои со встраиванием генов VTE-4 и VTE-3



Путь биосинтеза токоферолов:

ГТК — гомогентизиновая кислота;

фитил-ДФ — фитил-дифосфат;

МФБХ — 2-метил-6-фитилбензохинол;

ДМФБХ — 2, 3-диметил-5-фитилбензохинол.

Гены, кодирующие основные ферменты синтеза токоферолов:

VTE2 — гомогентизиновая фитилтрансфераза;

VTE1 — токоферолциклаза;

VTE3 — МФБХ метилтрансфераза;

VTE4 — токоферол метилтрансфераза

из арабидопсиса соотношение изоформ токоферолов изменяется, доля α -токоферола возрастает до 96–98%, β -токоферола — до 2–4%, а γ - и δ -изоформ снижается до $< 0,2\%$ [16]. Одновременная сверхэкспрессия генов VTE-4 и VTE-3 способствует превращению практически всех изоформ токоферолов в α -токоферол, тем самым существенно улучшая качество растения как продуцента витамина Е, хотя при этом общее количество токоферолов остается неизменным [17].

Увеличение концентрации всех изоформ токоферолов в 5 раз в листьях и в 2 раза в семенах арабидопсиса достигалось путем встраивания гена из *Synechocystis* sp., кодирующего гомогентизиновую фитилтрансферазу (VTE2). Сверхэкспрессия гена VTE2 в семенах арабидопсиса и сои увеличивает общий уровень токохроманолов в 1,8 и 1,4 раза соответственно. Одновременная экспрессия генов HPPD (*p*-гидроксифенилпируватдиоксигеназы) и TugA (префенат дегидрогеназы), продукты которых увеличивают количество доступного предшественника гомогентизиновой кислоты, приводит к повышению уровня токоферолов в 1,8 у арабидопсиса и в 2,6 раза у сои. Наибольшее содержание витамина Е в семенах модифицированного арабидопсиса (2,710 нг/мг) по сравнению с диким типом наблюдалось у трансгенных растений, у которых были встроены все три гена: VTE2, HPPD и TugA. Накопление токохроманолов в листьях и семенах растений достигалось экспрессией гомогентизиновой геранилгеранилтрансферазы [9].

Таким образом, с помощью генной инженерии частично решается проблема низкого содержания витамина Е и активной его изоформы в растениях. Однако, несмотря на все плюсы генетической трансформации, продвижение трансгенных продуктов на рынок до сих пор сталкивается с потребительским недоверием, в связи с чем поиск альтернативных источников природного витамина Е остается весьма актуальным. Токоферолы, как известно, способны синтезироваться и накапливаться только у фотосинтезирующих организмов и в большом количестве у некоторых микроводорослей, уже зарекомендовавших себя потенциально экономически выгодными продуцентами α -токоферола [20].

Микроводоросли — водные одноклеточные растительные организмы, содержащие хлорофилл и осуществляющие окислительный фотосинтез. К этой группе принадлежат

также цианобактерии *Cyanophyceae* [21]. В последнее время значительно возрос интерес к биотехнологии микроводорослей как источнику витаминов и других ценных биологически активных соединений, используемых для обогащения рациона людей и животных [22]. Коммерческое использование микроводорослей для извлечения специфических химических веществ началось с *Dunaliella salina*, культивируемой с 1970-х гг. для получения β -каротина. Широкое распространение получило культивирование *Haematococcus pluvialis* Flotow и *Cryptocodinium cohnii* Seligo для получения астаксантина и длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот, соответственно [23]. Из более чем 25 тыс. известных на сегодняшний день микроводорослей в коммерческих целях используется не более 15–17 видов. Они накапливают в больших количествах разнообразные биологически активные вещества и входят в состав многих пищевых добавок. Водоросли и их экстракты используют в косметике и в производстве кормов для животных. Выделены штаммы микроводорослей для коммерческого получения полиненасыщенных жирных кислот: γ -линолевой (*S. platensis*), арахидоновой (*Porphyridium cruentum*), докозагексановой (*C. cohnii*, *Schizochytrium* sp.), эйкозапентаеновой (*N. oculata*, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Nitzschia* sp.), а также пигментов (*D. salina*, *H. pluvialis*) и фикобилипротеинов (*S. platensis*, *P. cruentum*) [24].

Успешное использование микроводорослей в биотехнологии во многом зависит от выбора продуцента и подбора оптимальных условий его культивирования. Определены виды микроводорослей, способных к аккумуляции токоферолов: *S. platensis*, *D. tertiolecta*, *Synechocystis* sp., *N. oculata*, *T. suecica*, *E. gracilis*, *D. salina*, *I. galbana*, *D. vlkianum*, виды *Chlorella*, *Clamydomonas* и *Ochromonas*. Отдельные штаммы пресноводной микроводоросли *E. gracilis* и морской микроводоросли *D. tertiolecta* продуцируют α -токоферол в высших концентрациях, чем в продуктах, которые традиционно используют в качестве источника витамина E [19].

Продуктивность и динамику накопления токоферолов в клетках этих штаммов детально исследовали. Однако из-за различий в условиях культивирования результаты противоречивы. В одном и том же штамме в разных условиях концентрация токоферолов может отличаться многократно, до

семи раз. Например, для *N. oculata* установлено, что концентрация токоферолов существенно изменяется в зависимости от фотопериода, химического состава питательной среды, стадии роста [25]. Для использования в качестве продуцентов токоферолов микроскопические водоросли должны быть способны к быстрому росту на простых и дешевых питательных средах, иметь низкую чувствительность к контаминации другими микроорганизмами, накапливать в клетках большое количество всех изоформ токоферолов и, главным образом, α -токоферола [19].

Внутриклеточное содержание α -токоферола зависит от условий культивирования, поэтому основным способом повышения содержания этого витамина является модификация состава культуральных сред, температурного и светового режимов. Экспериментально установлено влияние возраста культуры, температуры, фотопериода, содержания азота, интенсивности освещения, типа углеродного питания и природы экзогенных органических питательных добавок. Проведенные исследования позволяют сделать вывод о стимуляции синтеза токоферолов активными формами кислорода, образующимися в клетках в условиях повреждения [19, 26].

D. tertiolecta и *T. suecica* — морские одноклеточные зеленые (*Chlorophyceae*) жгутиковые водоросли с высоким содержанием липидов. Количество α -токоферола в клетках при фотогетеротрофном культивировании достигает 0,5 мг/г сухого веса клеток *D. tertiolecta* и 0,6 мг/г — *T. suecica* [27].

При фотогетеротрофном культивировании одноклеточных зеленых водорослей *D. salina* и *N. oculata* содержание α -токоферола в конце экспоненциальной фазы составляло 0,37 и 0,5 мг/г сухой массы клеток, соответственно. При выращивании этих культур микроорганизмов в условиях дефицита азота содержание α -токоферола возрастало до 3,83 мг/г у *D. salina* и 0,95 — у *N. oculata*. В поздней стационарной фазе роста количество α -токоферола в клетках *N. oculata* увеличилось до 2,33 мг/г сухой массы. При этом уменьшение содержания азота в питательной среде ниже оптимального уровня угнетало рост микроводоросли [28, 29]. Таким образом, условия стимуляции биосинтеза витамина E негативно сказываются на накоплении биомассы микроводорослей, что снижает их продуктивность в единицу времени.

Содержание токоферолов в пересчете на клетку у других представителей зеленых одноклеточных водорослей родов *Chlorella* и *Chlamydomonas*, а также цианобактерии *Spirulina* невысоко, поэтому, несмотря на простоту выращивания и быстрое накопление биомассы, эти культуры не рассматриваются как перспективные продуценты витамина E [30].

Из анализа литературы следует, что наиболее изученным родом микроводорослей из числа потенциальных продуцентов токоферолов является *Euglena* spp. Внутриклеточная концентрация витамина E в некоторых штаммах *E. gracilis* может варьировать в широких пределах в зависимости от условий культивирования и, согласно некоторым данным, достигать показателя 7,35 мг/г клеток с содержанием α -токоферола до 95% [20]. В конце экспоненциальной фазы роста при фотоавтотрофном культивировании концентрация α -токоферола в клетках *E. gracilis* составляет в среднем 1,56 мг/г сухой массы клеток, что больше чем у *S. platensis* (0,063 мг/г), *I. galbana* (0,058 мг/г), *D. tertiolecta* (0,12 мг/г), *T. suecica* (0,42 мг/г), *D. vlkianum* (0,069 мг/г), *N. oculata* (0,51 мг/г) [28, 31, 32]. Согласно данным авторов, сравнивших 285 штаммов микроорганизмов — потенциальных продуцентов токоферолов, *E. gracilis* является наиболее перспективным сырьем для биотехнологического получения витамина E [20, 33]. Оптимизация синтеза α -токоферола культурой *E. gracilis* включает модификацию условий культивирования, двухстадийное выращивание и поиск субстратов, способствующих не только росту, но и накоплению α -токоферола данным организмом [5].

Микроводоросль *E. gracilis* способна ассимилировать разнообразные органические источники углерода (глюкоза, ацетат, глутамат, пируват, малат, этанол и др.), достигая плотности клеток 10,8 г сухой массы на 1 л при культивировании в среде с подобранным комбинированным их содержанием [26]. Этот организм одинаково хорошо растет и в автотрофных, и в гетеротрофных условиях, имеет широкий оптимум pH и температуры роста, не слишком прихотлив к интенсивности освещения, адаптирован к дефициту кислорода.

Одним из простейших и дешевых способов увеличения выхода витамина E из микроводоросли *E. gracilis* является вариация условий культивирования. При фотогете-

ротрофном культивировании достигается высокий прирост биомассы клеток *E. gracilis* за единицу времени при меньшем содержании антиоксидантных витаминов, чем в фотоавтотрофной культуре. Для эффективного продуцирования этих витаминов рекомендовано применять двухстадийное культивирование. На первом этапе культуру выращивают фотогетеротрофно, а на втором — переходят на фотоавтотрофный режим культивирования. Таким образом, сначала происходит накопление биомассы, а затем создаются условия, благоприятные для биосинтеза токоферола. Удачным примером использования двухэтапного культивирования является работа [30]. В условиях этих экспериментов концентрация клеток *E. gracilis* достигала 19 г/л на 6-е сут фотогетеротрофного (или гетеротрофного) культивирования. Это в 7 раз больше, чем максимальное накопление биомассы за такой же период при фотоавтотрофном режиме выращивания. Последующий перевод клеток в фотоавтотрофный режим на трое суток дал возможность увеличить содержание витамина E в 2–3 раза в пересчете на клетку. При этом значительно, более чем в 2 раза, возрастали также концентрации β -каротина и витамина C. В контрольной культуре *E. gracilis*, которую в течение всех 9 сут эксперимента выращивали в фотоавтотрофном режиме, содержание витаминов в пересчете на клетку было таким же, как и в опыте, однако накопление биомассы за этот период составляло лишь 10–15% от общего количества клеток опытного варианта культуры [30].

Применение метода двухстадийного культивирования при выращивании некоторых других водорослей не дал положительного эффекта. Так, хотя микроводоросль *D. tertiolecta* и накапливала несколько большее количество токоферолов на клетку, однако биомасса и общий выход витамина E существенно не увеличивались [30].

Применение циклического фотоавтотрофно-гетеротрофного режима культивирования, при котором клетки на протяжении дня культивируются фотоавтотрофно, а ночью гетеротрофно, решает проблему потери биомассы ночью и непрерывного накопления биомассы в условиях циклов свет-темнота [34].

Синтез токохроманолов в клетках *E. gracilis* можно стимулировать путем внесения в питательную среду экзогенных источни-

ков углерода и азота. Этот организм способен утилизировать разнообразные органические вещества, причем некоторые из них существенно стимулируют рост клеток и увеличивают содержание витамина Е. Накопление биомассы при гетеротрофном культивировании микроводорослей в солевой питательной среде в присутствии этанола на 19-е сут доходило до 39,5 г/л, что больше, чем при фотоавтотрофном или даже фотогетеротрофном культивировании, и может быть экономически целесообразным, поскольку гетеротрофное выращивание не зависит от источников освещения. Содержание токоферолов в этом эксперименте составляло 1,2 мг/г клеток, что немного уступает показателям, полученным при фотоавтотрофном (1,56 мг/г клеток) и двухстадийном фотогетеротрофно-фотоавтотрофном культивировании (1,45 мг/г клеток). Скорость накопления α -токоферола составляла $102,1 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{час}^{-1}$ [35]. Намного большая концентрация α -токоферола (6,1 мг/г) была получена при использовании мутантного штамма *E. gracilis* с добавлением в питательную среду предшественников синтеза α -токоферола [33]. Существует предположение, что ацетил-КоА, образованный в процессе метаболизма этанола, может быть использован как предшественник синтеза токоферолов. Этанол снижает вероятность заражения культуры другими микроорганизмами и способствует накоплению парамилона, запасного полисахарида *E. gracilis*, который обладает иммуностимулирующим действием и может быть использован в качестве перспективного сырья для получения фармпрепаратов [36, 37].

Еще больший положительный эффект может быть достигнут при использовании комбинации экзогенно внесенных органических

соединений. Так, одновременное внесение этанола и глюкозы уже через 6 сут позволяет достичь накопления биомассы до 19,69 г/л при концентрации α -токоферола 1,19 мг/г клеток [38]. При добавлении этанола вместе с малатом и глутаматом уже на 5-е сут гетеротрофного культивирования содержание токоферола достигает 3,7 мг/г клеток [26]. Данные о содержании α -токоферола в клетках *E. gracilis* при культивировании разными способами, представленные в табл. 2, показывают, что микроводоросль *E. gracilis* способна накапливать α -токоферол в значительно больших количествах, чем семена подсолнуха (0,27 мг/г) и сои (0,2 мг/г) [26].

Следует также отметить, что клетки *E. gracilis* не имеют целлюлозной клеточной стенки, что значительно облегчает экстракцию токоферолов. Биомасса *E. gracilis* съедобна, легко усваивается и ассимилируется в организме человека и животных. Клетки помимо α -токоферола в больших количествах накапливают и другие антиоксиданты, такие как β -каротин, витамин С, глутатион, полиненасыщенные жирные кислоты, все 20 основных аминокислот и иммуностимулирующий разветвленный полисахарид β -гликан (парамилон) [39]. Биомасса *E. gracilis* имеет высокую питательную ценность и может использоваться как корм для животных и в пищевых добавках [40].

Таким образом, данные литературы позволяют сделать вывод, что благодаря простоте и экономичности процесса гетеротрофного культивирования микроводоросль *E. gracilis* рассматривается как перспективный продуцент витамина Е и может быть предложена в качестве выгодной замены природным коммерческим источникам — растительным маслам.

Таблица 2. Содержание α -токоферола в клетках микроводоросли *E. gracilis* при разных способах культивирования

Фаза роста культуры	Условия культивирования	Содержание α -токоферола (мг/г сухой массы)	Литература
Конец экспоненциальной фазы	Фотоавтотрофное	1,56	[35]
—	Фотоавтотрофно-фотогетеротрофное двухстадийное	1,45	
—	Гетеротрофное (этанол)	1,2	
Экспоненциальная фаза	Гетеротрофное (этанол)	1,4	[26]
—	Гетеротрофное (этанол+глутамат)	2,45	
—	Гетеротрофное (этанол+глутамат+малат)	3,7	

REFERENCES

1. Abbasi A. Functional analysis of tocopherol biosynthesis in plants. *Aus Tehran: IRI*. 2007, 171 p.
2. Preedy V., Watson R. The encyclopedia of vitamin E. London: CABI Publishing. 2007, 945 p.
3. Müller L., Theile K., Böhm V. In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010, 54(5), 731–742.
4. Niki E., Noguch N. Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Acc. Chem. Rec.* 2004, V. 37, P. 45–51.
5. Survase S., Bajaj I., Singal R. Biotechnological production of vitamins. *Food Technol. Biotech.* 2006, 44(3), 381–396.
6. Natural source vitamin E. A global market overview. *New York*. 2013, 345 p.
7. Weiser H., Riss G., Kormann A. Biodiscrimination of the eight α -tocopherol stereoisomers results in preferential accumulation of the four 2R forms in tissues and plasma of rats. *J. Nutr.* 1996, 126(10), 2539–2549.
8. Jensen S., Lauridsen C. α -Tocopherol stereoisomers. *Vitam. Horm.* 2007, V. 76, P. 281–308.
9. Henry V., Qungang Q. Biotechnological production and application of vitamin E: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotech.* 2005, V. 68, P. 436–444.
10. World Health Organization. Human Vitamin and mineral requirements: report of a joint FAO/WHO expert consultation. Rome: VTC. 2001, 341 p.
11. Schwartz H., Ollilainen V., Piironen V., Lampi A. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *J. Food Comp. Anal.* 2008, 21(2), 152–161.
12. Herting D., Drury E. Vitamin E content of vegetable oils and fats. *J. Nutr.* 1965, N 81, P. 335–341.
13. <http://www.medicinalfoodnews.com/vol01/issue6/vegyoils>
14. Warner K., Mounts T. Analysis of tocopherols and phytosterols in vegetable oils by HPLC with evaporative light-scattering detection. *JAOCs*. 1990, 67(11), 827–831.
15. <http://www.cyberlipid.org/vite/vite0001.htm>
16. Rocheford T., Wong J., Egesel C., Lambert R. Enhancement of vitamin E levels in corn. *J. Amer. Coll. Nutr.* 2002, 21(3), 191–198.
17. Rippert P., Scimemi C., Dubald M., Matringe M. Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. *Plant Physiol.* 2004, V. 134, P. 92–100.
18. Shintani D., Della Penna D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science*. 1998, V. 282, P. 2098–2100.
19. Van Eenennaam A. I., Lincoln K., Durrett T. P., Valentin H. E., Shewmaker C. K., Thorne G. M., Svang J., Baszis S. R., Levering C. K., Aasen E. D., Hao M., Stein J. C., Norris S. R., Last R. L. Engineering vitamin E content: from Arabidopsis mutant to soy oil. *Plant Cell*. 2003, V. 15, P. 3007–3019.
20. Ogbonna J. Microbiological production of tocopherols: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotech.* 2009, V. 84, P. 217–225.
21. Tomaselli L. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied phycology. Oxford: Blackwell. 2004, 566 p.
22. Zolotariova O. K., Shniukova E. I., Sivash O. O., Mikhailenko N. F., Kotinskiy A. V. Prospects of microalgae using in biotechnology. *Kyiv: Alterpres*. 2008, 234 p. (In Ukrainian).
23. Raja R., Hemaiswarya S., Kumar N. A., Sridhar S., Rengasamy R. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Crit. Rev. Microbiol.* 2008, N 34. P. 77–88.
24. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 2006, 101(2), 87–96.
25. Brown M., Mular M., Miller I., Farmer C., Trnnerly C. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 1999, N. 11, P. 247–255.
26. Rodriguez-Zavala J., Ortiz-Cruz M., Mendoza-Hernandez G., Moreno-Sanchez R. Increased synthesis of α -tocopherol by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. *J. Appl. Microbiol.* 2010, V. 109, P. 2160–2172.
27. Carballo-Cardenas E., Tuan P., Janssen M., Wijffels R. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomol. Eng.* 2003, V. 20, P. 139–147.
28. Durmaz Y. Vitamin E (α -tocopherol) production by marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Aquaculture*. 2007, V. 272, P. 717–722.
29. Abd El-Baky H., Farouk K., El Baz G. S., El-Baroty G. S. Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. *Int. J. Agricult. Biol.* 2004, 6(1), 49–57.
30. Takeyama H., Kanamaru A., Yoshino Y., Kakuta H., Kawamura Y., Matsunaga T. Production of antioxidant vitamins, β -carotene, vitamin C, and vitamin E, by two-step culture of *Euglena gracilis* Z. *Biotech. Bioeng.* 1997, V. 53, P. 185–190.
31. Yasar D., Sevket G. α -Tocopherol and fatty acids of *Spirulina platensis* biomass in glass panel bioreactor. *Pak. J. Biol. Sci.* 2006, 9(15), 2901–2904.

32. Fabregas J., Herrero C. Vitamin content of four marine microalgae. Potential use as source of vitamins in nutrition. *J. Indust. Microbiol.* 1990, V. 5, P. 259–264.
33. Tani Y., Osuka S. α -Tocopherol production by an analog-resistant strain of *Euglena gracilis* Z. *Agric. Biol. Chem.* 1989, V. 53, P. 2313–2318.
34. Ogbonna J., Ichige E., Tanaka H. Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 2002, V. 58, P. 532–538.
35. Ogbonna J. C., Tomiyama S., Tanaka H. Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* Z for efficient production of α -tocopherol. *J. Appl. Phycol.* 1998, V. 10, P. 67–74.
36. Afiukwa C., Ogbonna J. Effects of mixed substrates on growth and vitamin production by *Euglena gracilis*. *Afr. J. Biotech.* 2007, 6(22), 2612–2615.
37. Tani Y., Tsumura H. Screening for tocopherol-producing microorganisms and α -tocopherol production by *Euglena gracilis* Z. *Agric. Biol. Chem.* 1989, 53(2), 305–312.
38. Fujita T., Aoyagi H., Ogbonna J., Tanaka H. Effect of mixed organic substrate on α -tocopherol production by *Euglena gracilis* in photoheterotrophic culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 79(3), 371–378.
39. Vismara R., Vestri S., Kusmic C., Barsanti L., Gualtieri P. Natural vitamin E enrichment of *Artemia salina* fed freshwater and marine microalgae. *J. Appl. Phycol.* 2003, V. 15, P. 75–80.
40. Matsumoto T., Inui H., Miyatake K., Nakano Y., Murakami K. Comparison of nutrients in *Euglena* with those in other representative food sources. *Eco-Engineering.* 2009, 21(2), 81–86.

МІКРОВОДОРСТІ ЯК ПРОДУЦЕНТИ ТОКОФЕРОЛІВ

V. M. Mokrosnop
O. K. Zolotareva

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного
НАН України, Київ

E-mail: membrana@ukr.net

Мікродорості здатні накопичувати токоферолі у значних кількостях (до 4 мг/г сухої ваги). На відміну від рослинних олій, кількість α -токоферолу в яких невелика, мікродорості містять до 97% цього токохроманолу, що забезпечує високу біологічну активність вітаміну Е, вилученого із цих організмів. Наведено дані щодо вмісту токоферолів у еукаріотичних мікродоростей *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Euglena gracilis*, *Tetraselmis suecica*, *Diacronema vlkianum*, а також у ціанобактерії *Spirulina platensis*. Накопичення токоферолів у мікродоростях залежить від способу культивування. Найбільша кількість токоферолів синтезується у клітинах *Euglena gracilis* за гетеротрофного культивування. Такі технологічні прийоми, як двостадійне культивування, лімітування живильного середовища за деякими біогенними елементами, введення екзогенних джерел вуглецю, використовують для підвищення виходу α -токоферолу у мікродоростей. В огляді розглянуто також стратегію генетичної модифікації рослин, що сприяє підвищенню вмісту активного вітаміну Е.

Ключові слова: мікродорості, α -токоферол, двостадійне культивування.

MICROALGAE AS TOCOPHEROL PRODUCERS

V. M. Mokrosnop
E. K. Zolotareva

Institute of Botany of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: membrana@ukr.net

Microalgae are able to accumulate considerable amounts of tocopherols (up to 4 mg/g dry weight). The content of α -tocopherol to plant oils is low, whereas microalgae contain up to 97% of the tocopherols that provides high bioactivity. The data about the content of tocopherols in eukaryotic microalgae *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Euglena gracilis*, *Tetraselmis suecica*, *Diacronema vlkianum*, as well as in the cyanobacterium *Spirulina platensis* are given in the paper. The largest amounts of tocopherols are synthesized by *Euglena gracilis* cells at mixotrophic cultivation. The level of tocopherols in microalgae depends on cultivation conditions. Two-stage biotech cultivation techniques, limiting nutrition in some biogenic elements, the introduction of exogenous carbon sources are used to increase the yield of tocopherol from microalgae. The approaches to the genetic transformation of plants leading to higher content of active vitamin E are reviewed as well.

Key words: microalgae, α -tocopherol, two-step cultivation.