

В.М. Мокросноп, О.К. Золотарьова

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,
вул. Терещенківська, 2, 01004, Київ; тел.: +38(044) 234 12 59,
e-mail: membrana@ukr.net

АКУМУЛЯЦІЯ α -ТОКОФЕРОЛУ В КЛІТИНАХ МІКРОВОДОРОСТЕЙ

*До теперішнього часу рослинні олії є основним природним джерелом вітаміну Е. Серед сполук групи вітаміну Е найбільшу біологічну активність має α -токоферол, вміст якого в рослинних оліях відносно невеликий. Значно вищі концентрації α -токоферолу (до 4–6 мг/г сух. в.) накопичують деякі мікробіодорості, такі як *Euglena gracilis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis suecica* та ін. Через це останнім часом зростає інтерес до біотехнології мікробіодоростей з метою отримання сировини для виробництва вітамінів. Накопичення токоферолів у біомасі *E. gracilis* відбувається найефективніше за умов міксотрофного культивування.*

Розчинний у ліпідах α -токоферол є компонентом неензиматичної антиоксидантної системи і виконує функцію захисту клітинних мембран від активних форм кисню і вільних радикалів. В результаті багатьох досліджень встановлена залежність рівня накопичення α -токоферолу від умов культивування мікробіодоростей, включаючи інтенсивність світла, фотоперіод, рівень азоту, температуру, тип вуглецевого живлення тощо. При цьому, стресові умови стимулюють накопичення антиоксидантів у фотосинтезувальних організмах, але обмежують нормальну швидкість їхнього росту. Проблема збільшення виходу токоферолів вирішується в системах двоетапного культивування через розділення у часі стадії накопичення біомаси і стадії стимуляції біосинтезу α -токоферолу. Підвищення вмісту токоферолу при цьому досягається завдяки введенню екзогенних джерел вуглецю на етапі накопичення біомаси і лімітування живильного середовища за деякими біогенними елементами на етапі стимуляції синтезу антиоксиданту. У огляді наведені дані про вплив складу живильного середовища, типу живлення, температури, інтенсивності освітлення, техніки культивування на накопичення клітинами мікробіодоростей вітаміну Е.

Ключові слова: мікробіодорості, α -токоферол, двоетапне культивування

Токофероли разом з токотрієнолами складають клас токохроманолів, які синтезуються тільки оксигенними фотосинтезувальними організмами [31, 37] і, в тому або іншому ступені, проявляють активність вітаміну Е. Натуральний вітамін Е – це незамінна поживна речовина для тваринних організмів, яка широко використовується в клінічній та харчовій галузях. Серед 4-х ізоформ



(α -, β -, γ -, δ -) як токотрієнолів, так і токоферолів, найбільш високу біологічну активність має α -токоферол. Він є компонентом неензиматичної антиоксидантної системи, універсальним протектором клітинних мембран від окиснювального пошкодження, забезпечує захист рослинних і тваринних клітин від вільних радикалів і активних форм кисню [16, 37]. α -Токоферол є хіральною молекулою з трьома стереоцентрами. Вісім стереоізомерів α -токоферолу відрізняються за розташуванням груп навколо цих стереоцентрів. Природною формою є RRR- α -токоферол.

Завдяки специфічним хімічним властивостям α -токоферол накопичується в ліпідному бішарі мембран тилакоїдів та оболонки хлоропласту і займає таке положення в мембрані, що перешкоджає контакту кисню з ненасиченими ліпідами мембран, захищаючи їх від перекисної деструкції [20]. Антиоксидантні властивості токоферолів зумовлені здатністю рухомого гідроксилу хроманового ядра безпосередньо взаємодіяти з вільними радикалами кисню ($O_2\cdot$, $HO\cdot$, $HO_2\cdot$), вільними радикалами ненасичених жирних кислот ($RO\cdot$, $RO_2\cdot$) і пероксидами жирних кислот [20]. В клітинах найбільш чутливими до окиснювального пошкодження є мітохондрії, оскільки вони містять велику кількість ненасичених ліпідів, що легко окиснюються. Разом з іншими антиоксидантами (наприклад, аскорбіновою кислотою, каротиноїдами, глутатионом) α -токоферол підтримує стабільний окисно-відновний статус хлоропластів, стабілізує мембранні структури в клітинах, запобігаючи окисненню подвійних зв'язків в молекулах каротину і вітаміну А, а також SH-груп мембранних білків. Стабілізуючий ефект токоферолу проявляється у зниженні споживання кисню клітинами, підвищенні їх стійкості до гіпоксії, зростанні спряженості мітохондріальних мембран і швидкості утворення АТФ. Токоферол відіграє регулюючу роль у фотосинтезі та метаболізмі макроелементів [30].

Олії є традиційним джерелом вітаміну Е, однак при досить високому загальному рівні цих сполук відносний вміст α -токоферолу в них невеликий і поступається деяким видам мікроводоростей. Питомий внесок α -токоферолу у фракцію вітаміну Е клітин мікроводоростей може досягати 95% [25, 35].

Оскільки споживчий попит на вітамін природного походження зростає, посилюється інтерес до альтернативних продуцентів, таких як мікроскопічні водорості, розробляються і удосконалюються технології культивування водоростей з підвищеним вмістом токоферолів [18].

Біосинтез токоферолу

Протягом останніх десятиліть ензиматичні етапи біосинтезу токоферолу досліджені та детально описані [5, 8]. До біосинтезу токоферолу, який відбувається в основному в пластидах, залучені сполуки з двох метаболічних шляхів (рис. 1): тирозин і гомогентизинова кислота, які виробляються шикімачним шляхом, та фітилдифосфат (ФДФ), який є продуктом метилеритритолфосфатного шляху і утворюється з геранілгеранілдифосфату за участі геранілгеранілредуктази. Обидва субстрати, гомогентизинова кислота і ФДФ, за участю гомогентизинової фітилтрансферази, конденсуються з утворенням 2-метил-6-фітил-1,4-гідрохінону (МФГ), що трансформується до 2,3-ме-



тил-5-фітил-1,4-гідрокінону. Останній за участю токоферолциклази перетворюється у γ -токоферол, з якого синтезується α -токоферол. Ця остання реакція ланцюга біосинтезу каталізується γ -токоферолметилтрансферазою.

В результаті генетичних досліджень, проведених на модельних організмах (*Arabidopsis thaliana*, *Synechocystis* PCC6803), було визначено структурні гени, які кодують основні ферменти синтезу токохромолів.

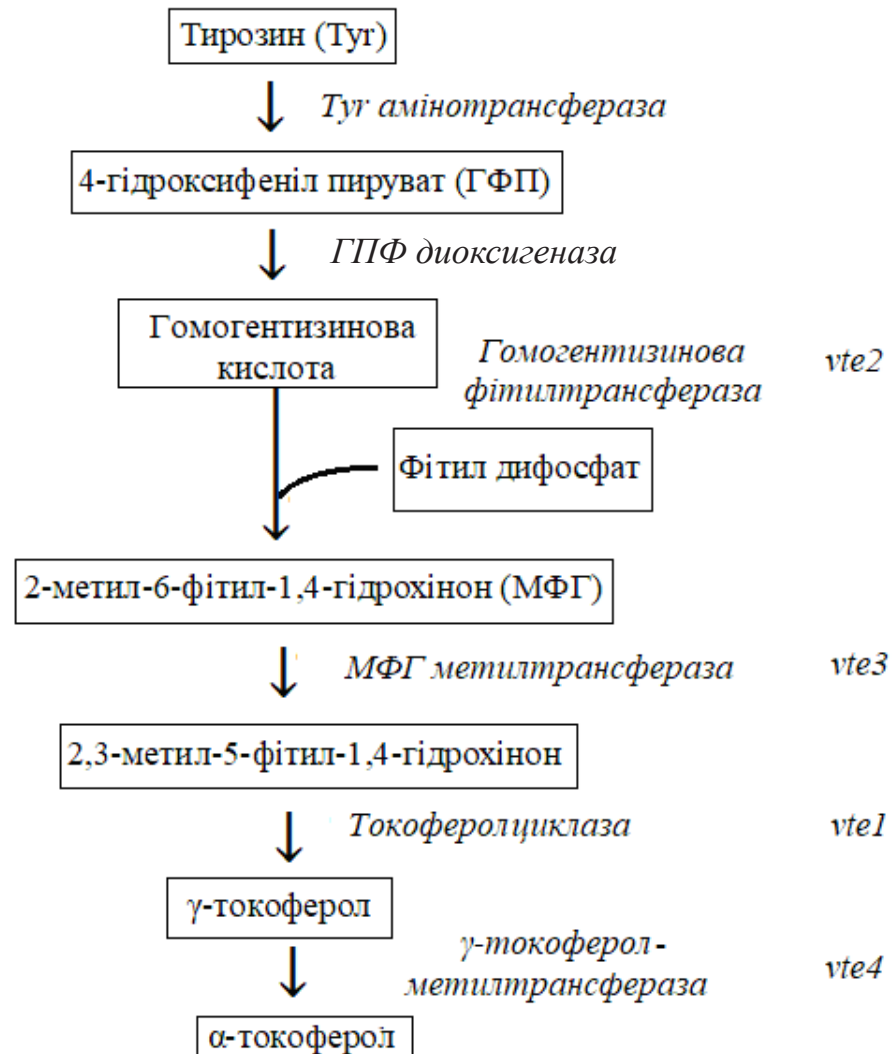


Рис. 1. Схема біосинтезу γ - і α -токоферолів. У правій частині схеми позначені гени, які кодують ключові ензими [8]

Fig. 1. Scheme of the biosynthesis of γ - and α -tocopherols. The right side of the diagram shows the genes that encode key enzymes [8]

Шляхом підвищення/зниження рівня експресії окремих генів, або груп генів біосинтезу токоферолів, вдалося визначити процеси метаболізму, які чинять вплив на акумуляцію токоферолів та покращити вміст та склад цих сполук у дослідних вищих рослинах [8, 40]. Однак існує дуже мало робіт по генетичній модифікації мікроводоростей для збільшення накопичення токоферолу [39].

Акумуляція токоферолу у клітинах мікроводоростей залежить від виду мікроводорості та способу її культивування. Відносно нещодавно в роботі [13] з використанням методів скорострільної протеоміки і високоефективної та надфективної рідинної хроматографії був проведений порівняльний протеомний аналіз метаболічних шляхів біосинтезу α -токоферолу з деякими метаболітами при фототрофному (ФТ), міксотрофному (МТ) і гетеротрофному (ГТ) культивуванні клітин *Euglena gracilis* var. *saccharophila*. Модифіковане внесенням дріжджового екстракту (10 г/л) поживне середовище Хатнера [29] використовували як базове для вирощування всіх варіантів культур. У базове живильне середовище культур МТ- та ГТ- вносили глюкозу до 1,5%. Таким чином, клітини ФТ культур використовували як джерело карбону переважно атмосферний CO_2 , через фотосинтез, МТ- атмосферний CO_2 та глюкозу, ГТ- глюкозу. Всі культури засвоювали частину вуглецю із амінокислот дріжджового екстракту [13].

Результати показали, що режим вирощування має значний вплив як на вміст антиоксидантів, так і на активацію біосинтезу ензимів, залучених до їх формування [13]. Автори виявили в цілому 3843 нерезервних білків, з яких 1890 синтезувалися при всіх режимах культивування. Хоча всі ферменти, необхідні для синтезу α -токоферолу, були знайдені в транскриптомі *E. gracilis* [27], в першому протеомному дослідженні [13] не вдалося виявити послідовності для токоферолциклази (ЕС 5.5.1.24) і токоферол-О-метилтрансферази (ЕС 2.1.1.95) (табл. 1).

Інші ензими шляху біосинтезу α -токоферолу були ідентифіковані на рівні протеому, і всі вони активні в ФТ- культурах.

Експресія ГФП діоксигенази в клітинах ФТ-, МТ- та ГТ- культур, значно зростала при освітленні (табл.1), тоді як в темряві у ФТ- та МТ- культур експресія цього ензиму була слабкішою або значно слабшою, відповідно, а у ГТ- культурі пригнічувалася. Експресія МФГ метилтрансферази в темряві в різному ступені пригнічувалася при всіх режимах культивування: найбільше пригнічення відбувалося в МТ-, а найменше – у ГТ- культурах. Експресія ГФТ/ГГТ в клітинах ФТ- культури дещо активувалася, а у МТ- культурі пригнічувалася, тоді як в ГТ- культурі експресію цих ензимів виявити не вдалося.

Накопичення α -токоферолу в клітинах мікроводоростей за різних режимів культивування

Тип органічного субстрату, джерела вуглецю та/або нітрогену у середовищі мікроводорості має важливе значення для внутрішньоклітинного синтезу вітамінів. Експериментально виявлений вплив таких чинників, як температура, фотоперіод, інтенсивність світла, вміст азоту, тип вуглецевого живлення, вік обраної культури разом із природою екзогенних органічних поживних речовин.



Таблиця 1

Рівні ензимів шляху біосинтезу α -токоферолу у клітинах мікроводорості *E. gracilis* var. *saccharophila* за різних умов культивування (за даними [13])

Table 1

The levels of enzymes of the α -tocopherol biosynthesis pathway in the cells of microalga *E. gracilis* var. *saccharophila* under different conditions of cultivation (according to [13])

Ензими	Наявність/відсутність світла	ФТ	МТ	ГТ
ГФП діоксигеназа	темрява	↑↑	↑	↓↓
	світло	↑↑↑	↑↑	↑↑↑
ГФТ/ГГТ**	світло	↑	↓↓	н/в*
2-МФГМТ***	темрява	↓	↓↓↓	↓↓
Токоферолциклаза	темрява	н/в*	н/в*	н/в*
Токоферол-О-метилтрансфераза	світло	н/в*	н/в*	н/в*

Примітка: У колонці «ФТ» стрілками позначено вміст ензиму у культурі ФТ відносно інших білків під час екстракції, а у колонках «МТ» та «ГТ» – вміст ензиму у культурах МТ і ГТ відносно його значення для ФТ культури. ↑ - ↑↑ - ↑↑↑ - ряд стрілок, що позначають збільшення (зліва на право) відносного вмісту ензиму; ↓ - ↓↓ - ↓↓↓ - ряд стрілок, що позначають зменшення (зліва на право) відносного вмісту ензиму.

*Не виявлено

**Гомогентизинова фітилтрансфераза / геранілгеранілтрансфераза

***МФГ метилтрансфераза

Note: The enzyme content in the FT culture relative to other proteins during extraction is indicated by the arrows in the "FT" column, and relative to its value the enzyme content in MT and GT cultures in the "MT" and "GT" columns. ↑ - ↑↑ - ↑↑↑ - a series of arrows indicating the increase (from left to right) of the relative content of the enzyme; ↓ - ↓↓ - ↓↓↓ - a series of arrows indicating the decrease (from left to right) of the relative content of the enzyme.

* Not found

** Homogentisine phytyltransferase / geranylgeranyl transferase

*** 2-Methyl-6-phytyl-1,4-hydroquinone

Багатьма дослідженнями встановлено, що хоча швидкість росту ФТ-культур значно поступається МТ-культурам найбільш активна акумуляція α -токоферолу в клітинах мікроводоростей відбувається при фотоавтотрофному режимі вирощування [10, 22, 26, 29]. Ці спостереження добре ілюструють дані роботи [13], отримані при порівняльному вивченні динаміки росту і накопичення деяких метаболітів при ФТ-, МТ- і ГТ- культивуванні *E. gracilis* var. *saccharophila* (рис. 2). Видно, що в МТ-культурах протягом перших 24 годин культивування рівень α -токоферолу знижувався до рівня, меншого вихідної концентрації, а потім підвищувався до 1,40 мг×(г сух. в.)⁻¹ (рис. 2а).



В перерахунку на суху масу найбільшу кількість α -токоферолу за 72 год культивування накопичували клітини ФТ-культур: концентрація α -токоферолу у них досягала $2,52 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$, тоді як в МТ- і ГТ- культурах – $1,40$ і $0,21 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$, відповідно.

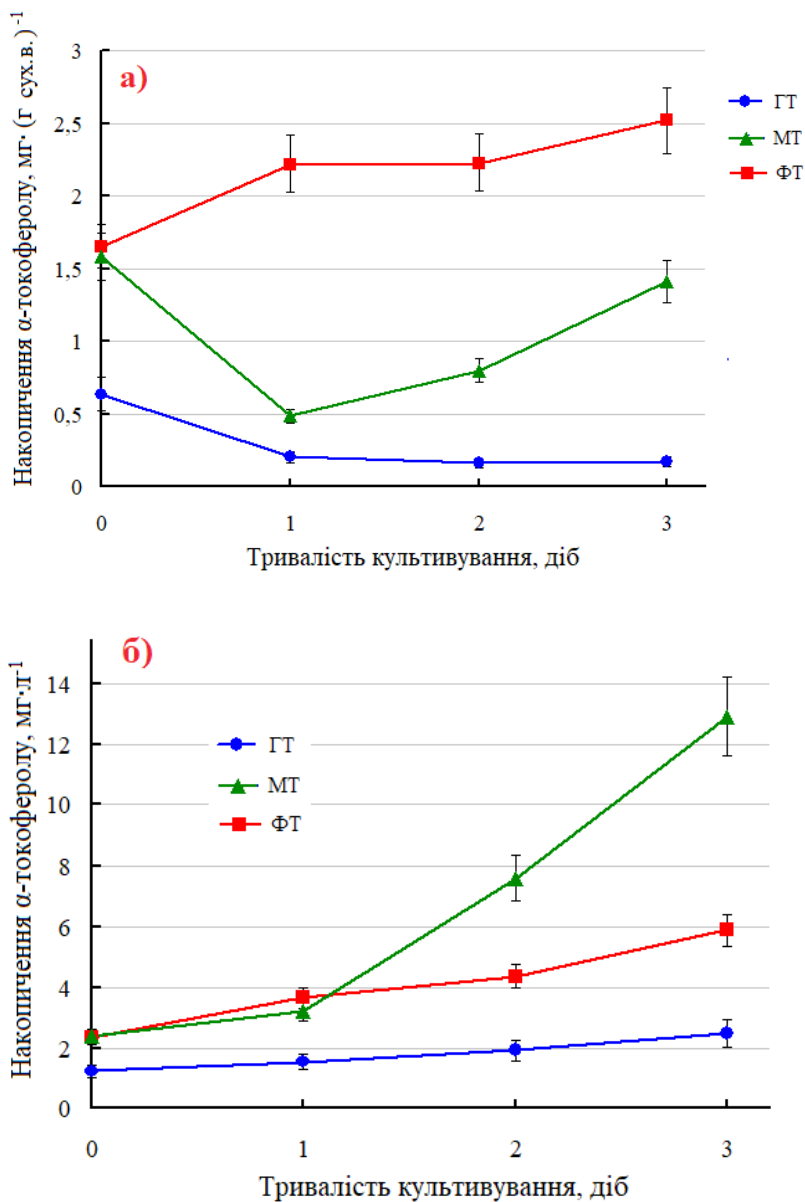


Рис. 2. Динаміка накопичення α -токоферолу у клітинах мікробіодорості *E. gracilis* var. *saccharophila* за різних режимів культивування. Концентрація α -токоферолу представлена у: а) $\text{мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$; б) $\text{мг} \times \text{л}^{-1}$. Графіки побудовані за даними роботи [13]

Fig. 2. Dynamics of α -tocopherol accumulation in the cells of microalga *E. gracilis* var. *saccharophila* under different regimes of cultivation. The concentration of α -tocopherol is presented in: a) $\text{mg} \times (\text{g dry w.})^{-1}$; b) $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$. Graphs are based on the data of [13]

Важливо підкреслити, що незважаючи на меншу концентрацію α -токоферолу в клітинах, його накопичення в перерахунку на літр культури було найвищим в МТ- культурах після 72 год вирощування (рис. 2б). Це пов'язано з більш інтенсивним ростом культури за МТ- умов. Такий же висновок був зроблений за результатами нашої роботи [22] при порівнянні накопичення α -токоферолу в ФТ- і МТ- культурах *E. gracilis*, вирощених при додаванні 100 мМ етанолу і 40 мМ глутамату. За цих умов загальний вихід α -токоферолу в МТ- культурі більше ніж вдвічі перевищував продукування цього вітаміну ФТ- культурою, хоча його вміст в перерахунку на клітину за МТ- умов був в 2–7 разів нижче ніж при ФТ- культивуванні.

Здатність деяких мікродоростей (*Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica*, *E. gracilis* та ін.) до гетеротрофного живлення може спрощувати культивування потенційного продуцента α -токоферолу за рахунок стимуляції росту культури органічними субстратами та синтезу α -токоферолу без освітлення [4]. У експериментах J. Ogbonna та ін. [26], акумуляція біомаси *E. gracilis* при ГТ культивуванні за присутності етанолу у сольовому живильному середовищі зростала до $39,5 \text{ г} \times \text{л}^{-1}$ на 19-у добу культивування, що перевищувало продуктивність як ФТ-, так і МТ- культур. Швидкість накопичення α -токоферолу в цих дослідках складала $102,1 \text{ мкг} \times \text{л}^{-1} \times \text{год}^{-1}$. Метаболізм етанолу у клітинах мікродорості супроводжується утворенням ацетил-КоА, який може виступати попередником синтезу токоферолів. На думку авторів, активація синтезу токохроманолів є наслідком помірною оксидативного стресу, який індукується в клітинах *E. gracilis* продуктом розщеплення етанолу – ацетальдегідом. Важливо також, що за наявності етилового спирту знижується ймовірність контамінації культури мікродорості іншими мікроорганізмами.

Таким чином, гетеротрофні культури мікродорості *E. gracilis*, які не залежать від освітлення, можуть бути перспективними комерційними продуцентами активного вітаміну Е і бути вигідною заміною нинішнім природним комерційним його джерелам – оліям [26].

Внутрішньоклітинний вміст α -токоферолу в клітинах водоростей залежить від умов культивування, отже, основним способом збільшення вмісту цього вітаміну є зміна складу живильного середовища, температурного та світлового режимів. Синтез токоферолів у клітинах мікродорості *E. gracilis* можна стимулювати внесенням екзогенних субстратів (етанол, глюкоза, глутамат, малат та ін.) та їх комбінацій [3, 9, 26]. Відповідно до даних, отриманих T. Fujita та ін. [9] внесення однієї лише глюкози у живильне середовище культури *E. gracilis* стимулює накопичення клітин культури в 5 разів, але етанол є найкращим субстратом для стимуляції акумуляції α -токоферолу у перерахунку на одиницю об'єму культурального середовища.

Комбінація глюкози та етанолу у співвідношенні 3:2 забезпечує продуктивність α -токоферолу на культуру $38,9 \text{ мкг} \times \text{л}^{-1} \times \text{год}^{-1}$, що більше ніж в 4 рази перевищувала швидкість накопичення α -токоферолу без екзогенного додавання джерел органічного вуглецю ($9,2 \times 10 \text{ мкг} \times \text{л}^{-1} \times \text{год}^{-1}$). Культивування *E. gracilis* з підкормкою у біореакторі з внесенням суміші субстратів кожні 24 год після перших 48 год до 120 год культивування дозволяє підвищити продукування α -токоферолу до $162,7 \text{ мкг} \times \text{л}^{-1} \times \text{год}^{-1}$ [9].



Як речовини-стимулятори синтезу токоферолів у клітинах мікроводорості *Stichococcus bacillaris* siva 2011 (Chlorophyta) використовували метилжасмонат [33]. Жасмонати синтезуються у клітинах рослин у відповідь на стреси та підвищують активність експресії деяких генів, залучених у захисні механізми рослинного організму. Один із таких генів кодує тирозин амінотрансферазу, яка бере участь у біосинтезі токоферолів. Дослідниками був проаналізований вплив різних концентрацій метилжасмонату у живильному середовищі *S. bacillaris* (50, 100 та 200 мкл), з-поміж яких найменша концентрація мала найбільш виражений вплив на продукування вітаміну Е. На 24-у годину культивування *S. bacillaris* у біореакторі за наявності 50 мкл жасмонату рівень RRR- α -токоферолу у клітинах організму зростав на ~50% порівняно із контрольним варіантом, досягаючи $1,3 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$. Цитотоксична дія більших концентрацій метилжасмонату та триваліший період експозиції негативно впливали на інтенсивність синтезу токоферолів [33].

Вплив світла і температури на продукування токоферолу мікроводоростями

Біосинтез α -токоферолу відбувається лише в фотосинтезуючих організмах [35], але літературні повідомлення щодо локалізації α -токоферолу у клітинах та його відношення до фотосинтезу є суперечливими [17, 23, 32, 34]. Вважається, що мітохондрії, так як і хлоропласти беруть участь в синтезі α -токоферолу [17, 31]. Утворення токоферолів відбувається у темряві при ГТ-культивуванні [28]. α -Токоферол накопичується також у позбавлених хлорофілу штаммах *E. gracilis* [29], при чому його біосинтез навіть стимулюється світлом [17]. Порівняльне дослідження вмісту α -токоферолу в мутанті *E. gracilis* (WZSL), не здатному до фотосинтезу, та дикому типі за фотогетеротрофних та гетеротрофних умов показали значне збільшення на світлі (майже на 100%) вмісту цього вітаміну в обох штаммах, незалежно від наявності хлоропластів. Тобто, кореляція між освітленням та виробленням вітаміну Е не пов'язана з фотосинтезом.

Експериментальне вивчення впливу інтенсивності освітлення і температури на накопичення α -токоферолу у різних видів фітопланктонних водоростей показало широкий діапазон реакцій [14]. За високої щільності потоку фотонів при підвищенні температури від 5°C до 25°C концентрації α -токоферолу поступово збільшувалися у *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyta) та *Prorocentrum cordatum* (Dinophyta). У всіх випадках, коли було зафіксовано значний вплив щільності потоку фотонів, також спостерігалася залежність продукування α -токоферолу від температури та/або комбінований ефект із температурою, за винятком штаму *D. tertiolecta* (Chlorophyta). Вміст α -токоферолу у цьому штамі зростав за високої щільності потоку фотонів незалежно від температури. Накопичення вітаміну в клітинах *Nodularia spumigena* (Cyanophyta), навпаки, посилювалося при низькій щільності потоку фотонів незалежно від температури. У багатьох випадках ці реакції виявляли подібні або протилежні закономірності щодо концентрацій антиоксидантів. Недавні дослідження показали, як забезпечення світлом або органічним вуглецем



впливає на вироблення розчинних у ліпідах клітинних компонентів, таких як α -токоферол [12, 39].

Слід відмітити, що у вищих рослин токофероли відіграють важливу роль в адаптації до стресів при низьких і високих температурах [19]. Відзначено вплив низької температури на вироблення токоферолу *E. gracilis* Z. Хоча в перші кілька годин низькотемпературного впливу спостерігалось незначне зниження вироблення α -токоферолу, його накопичення значно посилювалося протягом періоду адаптації (приблизно 50 год.), а після 100 годин стресу концентрація приблизно в 11 разів перевищувала контрольне значення [28].

Стимуляція синтезу α -токоферолу за умов помірного стресу

При ФТ- та МТ- культивуванні в первинних фотохімічних реакціях, які відбуваються у фотосинтетичних мембранах, утворюється велика кількість O_2 і активних форм кисню (АФК). Крім того, АФК виробляються у плазматичній мембрані, електрон-транспортною системою в мітохондріях [32], а також в ході інших метаболічних процесів, локалізованих у різних клітинних компартментах. У природному середовищі водорості постійно піддаються впливу різних абіотичних стресів, що призводять до зростання вмісту АФК, які викликають окиснювальну деструкцію клітинних структур. Кожен вид мікроводоростей по-різному реагує на різні типи стресів, мобілізуючи через клітинні зв'язки захисні антиоксидантні системи рослини, до яких залучені неферментативні антиоксиданти, такі як каротини, флавоноїди і ліпофільні токофероли. Залежно від умов, вміст токоферолу може відрізнятись до семи разів в клітинах одного штаму. Ця адаптивна реакція на стрес використовується в біотехнологічних регламентах для комерційного вирощування мікроводоростей з підвищеним вмістом специфічних антиоксидантних сполук.

Дослідження О. Mudimu та співавт. [24] на 130 штаммах водоростей та ціанобактерій показали, що більш висока концентрація α -токоферолу в клітинах досягається під час стаціонарної фази росту і є найвищою за наявності лише чверті стандартної кількості азоту у вигляді нітрату в живильному середовищі. Разом з цим дослідники вказали на залежність кількості накопиченого вітаміну Е в мікроводоростях від таксономічної приналежності організму. Найменші кількості α -токоферолу були виявлені у представників класів Rhodophyta та Streptophyta [24] (табл. 2).

Дослідження морських планктонних водоростей як можливого джерела біомаси, багаті вітаміном Е, показало, що серед п'яти досліджуваних видів мікроводоростей (*T. suecica*, *D. tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* (Haptophyta), *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta), *Chaetoceros caletoceros* (Bacillariophyta) найбільшу кількість вітаміну Е накопичує *T. suecica* – морська одноклітинна зелена водорість, яка містить відносно велику кількість ліпідів і токоферолів. Вміст α -токоферолу в клітинах *T. suecica* досягає $6,3 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$, що еквівалентно вмісту вітаміну Е в зародках кукурудзи [6].

Морську мікроводорість *Nannochloropsis oculata* (Ochrophyta) використовують в аквакультурі для живлення коловерток, яких розводять для годування мальків риб, креветок, крабів, мідій. При визначенні шляхів підвищення харчової цінності первинної стадії цього трофічного ланцюга було



Таблиця 2

Вміст α -токоферолу в клітинах мікрободоростей та ціанобактерій за оптимальних умов та з обмеженням вмісту нітрогену у середовищі (за даними О. Mudimu та співавт.) [24]

Table 2

The content of α -tocopherol in the cells of microalgae and cyanobacteria under optimal conditions and with limited nitrogen content in the environment (according to O. Mudimu et al.) [24]

Відділ	Клас	Вид мікрободорості	Концентрація α -токоферолу (мкг \times г ⁻¹) в стаціонарній фазі росту	
			За стандарт. умов	За нестачі нітрогену
Chlorophyta	Chlorophyceae	<i>Haematococcus pluvialis</i>	580,43	1179,91
		<i>Coccomyxa</i> sp.	663,86	1062,02
Heterokontophyta	Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis oculata</i>	575,10	1445,66
		<i>Microchloropsis salina</i>	671,80	1094,19
Streptophyta	Klebsormidiophyceae	<i>Klebsormidium crenulatum</i>	92,47	-
		<i>Interfilum terricola</i>	47,90	-
Rhodophyta	Porphyridiophyceae	<i>Porphyridium purpureum</i>	43,45	89,54
		<i>P. sordidum</i>	61,68	-
Цяанобактерія	Cyanophyceae	<i>Synechocystis</i> sp.	173,67	-
		<i>Arthrospira maxima</i>	177,23	-

встановлено, що вміст токоферолу в клітинах *N. oculata* неухильно зростає з віком культури, що пов'язано з посиленням антиоксидантного захисту клітин при старінні. Дефіцит нітрогену – одного із ключових елементів метаболізму призводить до розвитку окиснювального стресу, що індукує синтез антиоксидантів.

Вивчення впливу різних концентрацій і форм азоту на накопичення антиоксидантів показало, що при зниженому рівні нітратів накопичення α -токоферолу в культурі *N. oculata* зростало [7]. Наявність нітратів у живильному розчині в концентрації 441 мкМ є стимулом для підвищення виходу токоферолу (до 2,33 мг \times (г сух. в.)⁻¹) з культури на пізній стаціонарній фазі росту. Вміст α -токоферолу був на 26% вищим порівняно з культурою, яка зростала в середовищі з подвійним вмістом нітратів. Важливо зазначити, що водорості на ранній стадії росту в середовищі живлення з такою ж кількістю нітрату (441 мкМ), містили на 59% меншу кількість вітаміну Е. На противагу вирощуванню на нітраті, присутність азоту у тих самих концентраціях в інших формах не мала аналогічного впливу на динаміку акумуляції вітаміну [7]. Доведено, що нітрат найбільше сприяє накопиченню α -токоферолу у клітинах мікрободорості, порівняно з нітритом, амонієм, сечовиною, взятими у концентрації, що відповідає однаковій кількості атомів азоту на літр живильного середовища [15].

Вплив азотного голодування поряд з ефектом високої концентрації NaCl та опромінення УФ-В на синтез антиоксидантів у мікрободорості *D. salina*



(Chlorophyta) вивчався Н. Abd El-baky [1]. Згідно з результатами, антиоксидантний захист у клітинах *D. salina*, вирощених в оптимальному живильному середовищі, збільшується під опроміненням УФ-В, а також при високій концентрації NaCl та дефіциті азоту. Механізми захисту включають прискорений синтез антиоксидантних компонентів, включаючи α -токоферол, концентрація якого досягла максимального рівня в $3,83 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$ через сукупний вплив сольового стресу (16% NaCl) та дефіциту азоту (2,5 мМ) [1].

З іншого боку, за даними [11] на вміст α -токоферолу в *Chlorella vulgaris*, *P. tricornutum* та *T. suecica* позитивно впливало лише обмеження фосфатного живлення, тоді як продукування α -токоферолу *T. suecica* посилювалося в умовах, насичення поживними речовинами [4].

Перевагами мікродоростей *D. tertiolecta* та *T. suecica* є їх невибагливість до середовища, здатність асимілювати органічні речовини та швидко накопичувати біомасу вище $70 \text{ г} \times \text{л}^{-1}$. Через це ці культури широко використовуються в аквакультурі для годівлі риби та личинок молюсків. Порівняння інтенсивності росту та накопичення α -токоферолу у *D. tertiolecta* та *T. suecica* в експерименті E. Carballo-Cardenas et al. [4] несподівано показали, що при збільшенні щільності клітин та зменшенні доступності світла зростали як концентрація клітин у культурі, так як і вміст токоферолу в клітинах. Таким чином, експеримент не виявив очікуваного впливу високої інтенсивності світла на вміст токоферолів як антиоксидантів, що захищають фотосинтетичний апарат від фотоокиснювальних пошкоджень. Автори вважають, що отримані дані показують, що внутрішньоклітинний синтез токоферолу стимулювався не тільки інтенсивністю світла, але й старінням культури. Ці результати вказують на можливість отримання великої кількості α -токоферолу з культур мікродоростей з високою щільністю клітин [4].

Показано, що накопичення токоферолу у змішаних культурах мікродоростей *E. gracilis* і *Selenastrum capricornutum*, які є компонентами аквакультур судака та сома, зростало при виснаженні поживних речовин у водоймі [36]. При зниженні концентрації амонійного нітрогену на 98,9–99,5 та фосфату на 98,4–99,8% від початкового рівня вміст токоферолу в біомасі водоростей зростав до $877,2 \text{ мкг} \times \text{л}^{-1}$, що перевищує вимоги до корму для риб. Таким чином, водорості за варіювання умов вирощування можуть забезпечити потреби риб в біологічно-активних речовинах.

Оптимізація синтезу α -токоферолу за умов двостадійного культивування мікродоростей

Ріст деяких видів водоростей (наприклад, евгленоїдних та зелених водоростей) можна оптимізувати для посиленого виробництва α -токоферолу [35], розділяючи у часі стадію накопичення біомаси і стадію стимуляції біосинтезу α -токоферолу. При двостадійному режимі культивування мікродорості спочатку вирощують в оптимальних для росту умовах. Потім мікродорості збирають та переводять на модифіковане середовище для подальшого культивування в стресових умовах, що посилює біосинтез токоферолу. Для підвищення продукування токоферолу застосовують також екзогенне додавання прооксидантів, таких як H_2O_2 [2].



Найбільш перспективним джерелом токоферолів вважаються представники роду *Euglena* spp., які накопичують цього вітаміну до $3,7 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$ із вмістом α -токоферолу до 97% [28, 30]. Клітини мікроводорості *E. gracilis* також накопичують у великих кількостях і інші антиоксиданти, такі як β -каротин, вітамін С, глутатіон, а також поліненасичені жирні кислоти, всі 20 основних амінокислот та імуностимулювальний поліцукрид β -глікан (парамілон) [38]. Завдяки високій поживній цінності цього організму та нетоксичності, його застосовують як основний корм чи підкормку для тварин, він споживається людиною у вигляді біологічно активних добавок [24].

Мікроводорість *E. gracilis* здатна асимілювати різноманітні органічні джерела вуглецю (глюкоза, ацетат, глутамат, сукцинат, піруват, малат, етанол та ін.), досягаючи маси клітин культури від $10,8$ до $19,0 \text{ г} \times \text{л}^{-1}$ на 5-у добу культивування в середовищі з оптимальним комбінованим вмістом субстратів [29, 34]. Цей організм також добре росте в автотрофних і гетеротрофних умовах культивування, має широкий оптимум рН та температури росту, не надто вибагливий до інтенсивності освітлення, має пристосування до дефіциту кисню. Клітини мікроводорості *E. gracilis* позбавлені целюлозної клітинної стінки, що значно полегшує екстракцію токоферолів і, у випадку використання біомаси *E. gracilis* у їжу, вона легко засвоюється та асимілюється. Проте, у порівнянні з деякими іншими мікроводоростями, *Dunaliella* і *Spirulina*, культура *E. gracilis* легко контамінується мікроорганізмами, що швидко ростуть [25].

МТ- клітини *E. gracilis* досягають високих показників накопиченої біомаси за одиницю часу, проте з меншим вмістом антиоксидантних вітамінів ніж у ФТ- культури. Для ефективного продукування цих вітамінів було застосовано двостадійне культивування [34]. Після того, як клітини *E. gracilis* були вирощені у культурі з підкормкою, у фотогетеротрофних (або гетеротрофних) умовах, їх густина досягала $19 \text{ г} \times \text{л}^{-1}$ на 6 добу з вмістом вітаміну Е лише $0,85 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$. Наступне перенесення цих клітин у сольове живильне середовище і фототрофне культивування протягом 3 діб підвищувало вміст у клітинах вітаміну Е до $1,45 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$, а β -каротину та вітаміну С до $3,41$ та $4,16 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$ відповідно. Водночас, такий же вміст зазначених сполук спостерігався в клітинах лише при фотоавтотрофному культивуванні. Система культивування з підкормкою у випадку двостадійного культивування є найбільш ефективною. Метод двостадійного культивування застосовували і до деяких інших водоростей. Так, наприклад, мікроводорість *D. tertiolecta* хоч і накопичує дещо більше токоферолів на клітину, проте фінальна концентрація клітин лишається невеликою, результатом чого є низький вихід вітаміну Е на одиницю об'єму культури, порівняно з культурою *E. gracilis*. Незважаючи на простоту вирощування і швидкий ріст, водорості *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Spirulina*, мають низький вміст вітаміну Е на клітину [34]. Застосування циклічної фотоавтотрофно-гетеротрофної системи культивування, за якої клітини протягом дня зростають фотоавтотрофно, а вночі гетеротрофно, дозволяє вирішити проблему втрати біомаси вночі та досягти тривалого росту культури в умовах циклів світло-темрява [25].

Акумуляція токоферолів у клітинах *E. gracilis* може бути значно підвищена при внесенні деяких сполук з-поміж широкого діапазону органічних



субстратів мікроводорості. Етанол є субстратом *E. gracilis*, який стимулює не тільки ріст культури та акумуляцію α -токоферолу, але і парамілону – запасного поліцукриду мікроводорості, який має біотехнологічне значення [26, 29]. Комбіноване внесення етанолу з іншими субстратами може стимулювати продуктивність культури. Найбільшу концентрацію α -токоферолу ($5,1 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$) було отримано з використанням мутантного штаму *E. gracilis* з додаванням у середовище попередників синтезу α -токоферолу тирозину та гомогентизату (рис. 1) [35]. *E. gracilis* здатна акумулювати α -токоферол у набагато більшій концентрації, ніж насіння соняшника ($0,27 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$) та сої ($0,2 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$) [29].

Вихід α -токоферолу з біомаси мікроводорості залежить не тільки від його внутрішньоклітинного вмісту, але і від способу екстракції вітаміну. J. Mendiola та ін. [21], які у низці вимірювань вмісту α -токоферолу у клітинах *Spirulina platensis* отримували результат всього лише $0,011\text{--}0,014 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$, змоделювали процес екстракції α -токоферолу рідким діоксидом вуглецю з метою виявлення найефективніших показників температури та тиску при екстракції. Параметри створеної J. Mendiola та ін. математичної моделі, оцінені із застосуванням множинної лінійної регресії, дозволяють розрахувати концентрацію токоферолів у екстрактах *S. platensis* як функцію значень тиску та температури екстракції. Оптимальні умови процесу екстракції, згідно статистичної програми, склали $83,3 \text{ }^\circ\text{C}$ та 362 бар і були експериментально перевірені. При дотриманні вказаних умов екстракції CO_2 у суперкритичному стані є теоретична можливість отримати концентрацію α -токоферолу $29,4 \text{ мг} \cdot (\text{г екстракту})^{-1}$, що перевищує його вміст у вихідній біомасі *S. platensis* у 12 разів [21].

α -Токоферол є природнім антиоксидантом необхідним для споживання людиною та тваринами. Природніми джерелами цього вітаміну є фотосинтезувальні організми. Вміст найбільш біологічно активної α -ізоформи токоферолів у клітинах рослин є невисоким, більше переважає γ -токоферол у оліях – основних джерелах вітаміну для людини. Через це досліджується можливість використання різноманітних підходів для підвищення накопичення α -токоферолу рослинами, включаючи генетичні, які дають найкращий результат. Проте, споживання трансгенних рослин не має популярності, а віддається перевага генетично не зміненому продуценту. Широка різноманітність напрямів використання біомаси мікроводоростей, в першу чергу, як джерела цінних біологічно активних та поживних сполук, звертає увагу і на можливість отримання вітаміну E із цих організмів. Ключовими чинниками є метаболічна пластичність, адаптивність, швидкий приріст біомаси мікроводоростей як продуцентів та можливість створення різноманітних контрольованих умов для їх вирощування. Низка досліджень вже було проведено з приводу підвищення вмісту α -токоферолу у клітинах мікроводоростей та встановлено важливість вибору виду мікроводорості з підбором до неї умов культивування для стимуляції накопичення вітаміну. Ці умови можуть бути відносно універсальними, так як помірний стрес, викликаний підвищенням інтенсивності освітлення та температури, солоністю, або опроміненням, дефіцит нітратів у живильному середовищі, присутність речовин-стимуляторів, або попередни-



ків синтезу токоферолів. Часто окремі види водоростей проявляють нетипову реакцію на умови стресу, тому може бути необхідність у підборі специфічних умов. Перспективний продуцент α -токоферолу *E. gracilis* має підвищений вміст цієї сполуки при вирощуванні у присутності етанолу, особливо у комбінації з іншими субстратами, що спостерігається як на світлі, так і у темряві. Помірні стресові чинники, наприклад, відхилення від оптимуму значень температури, інтенсивності освітлення та вмісту поживних речовин у середовищі, сприяють синтезу вітаміну, але пригнічують ріст культури, через що доцільним є гетеротрофне, або міксотрофне вирощування. Стадійність культивування дозволяє вирішити проблему низької інтенсивності накопичення біомаси в умовах стимуляції синтезу антиоксидантів та суттєво підвищити продуктивність культури.

В.М. Мокросноп, О.К. Золотарьова

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,
вул. Терещенківська, 2, 01004, Київ; тел.: +38(044) 234 12 59,
e-mail: membrana@ukr.net

АКУМУЛЯЦІЯ α -ТОКОФЕРОЛА В КЛЕТКАХ МІКРОВОДОРΟΣЛЕЙ

Реферат

*До настоящего времени растительные масла являются основным природным источником витамина E. Среди соединений группы витамина E наибольшую биологическую активность имеет α -токоферол, содержание которого в растительных маслах относительно небольшой. Значительно более высокие концентрации α -токоферола (до 4–6 мг/г сух. в.) накапливают некоторые микроводоросли, такие как *Euglena gracilis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis suecica* и др. Из-за этого последнее время увеличился интерес к биотехнологии микроводорослей с целью получения сырья для производства витаминов. Накопление токоферолов в биомассе *E. gracilis* происходит наиболее эффективно в условиях миксотрофного культивирования.*

Растворимый в липидах α -токоферол является компонентом неэнзиматической антиоксидантной системы и выполняет функцию защиты клеточных мембран от активных форм кислорода. В результате многих исследований установлена зависимость уровня накопления α -токоферола от условий культивирования микроводорослей, включая интенсивность освещения, фотопериод, уровень азота, температуру, тип углеродного питания и др. При этом, стрессовые условия стимулируют накопление антиоксидантов в фотосинтезирующих организмах, но ограничивают нормальную скорость их роста. Проблема увеличения выхода токоферолов решается в системах двухэтапного культивирования через разделение во времени стадий накопления биомассы и стадии стимуляции биосинтеза α -токоферола. Увеличение содержания токоферола при этом достигается благодаря введению экзогенных источников углерода на этапе накопления биомассы и лимитирование питательной среды по некоторым биогенным элементам на этапе стимуляции синтеза антиоксиданта. В обзоре приведены данные о влиянии



состава питательной среды, типа питания, температуры, интенсивности освещения, техники культивирования на накопление клетками микроводорослей витамина E.

Ключевые слова: микроводоросли, α -токоферол, двухэтапное культивирование

V.M. Mokrosnop, E.K. Zolotareva

M. G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine,
Tereshchenkivska str., 2, 01004, Kyiv; tel.: +38(044) 23412 59,
e-mail: membrana@ukr.net

ACCUMULATION OF α -TOCOPHEROL IN MICROALGAE CELLS

*To date, the main natural source of vitamin E is vegetable oils. Among the compounds of the vitamin E group, α -tocopherol has the higher biological activity, the relative content of which in vegetable oils is comparatively small. Significantly higher concentrations of α -tocopherol (up to 4-6 mg / g dry weight) accumulate some microalgae, such as *Euglena gracilis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis suecica* and others. Due to this, there has been a growing interest in biotechnology of microalgae as a raw material for the production of vitamins. The largest amount of tocopherols is synthesized in *Euglena gracilis* cells by myxotrophic cultivation.*

Lipid-soluble α -tocopherol is a component of the non-enzymatic antioxidant system and performs the function of protecting cell membranes from reactive oxygen species and free radicals. As a result of many studies, the dependence of the level of α -tocopherol accumulation on the conditions of cultivation of microalgae, including light intensity, photoperiod, nitrogen level, temperature, type of carbon nutrition, etc. At the same time, stressful conditions stimulate the accumulation of antioxidants in photosynthetic organisms, but limit the normal rate of their growth. The problem of increasing the yield of tocopherols is solved in systems of two-stage cultivation through the separation in time of the stage of biomass accumulation and the stage of stimulation of α -tocopherol biosynthesis. The increase in tocopherol content is achieved due to the introduction of exogenous carbon sources at the stage of biomass accumulation and limiting the nutrient medium for some nutrients at the stage of stimulating the synthesis of antioxidants. The review presents data on the effects of the composition of the nutrient medium, type of nutrition, temperature, light intensity, cultivation technique on the accumulation of vitamin E by microalgae cells.

Key words: microalgae, α -tocopherol, two-stage cultivation



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Abd El-baky H.H., El Baz F.K., El-Baroty G.S.* Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina* // *Int. J. Agric. Biol.* – 2004. – Vol. 6. – P. 49–57.
2. *Abd El-Baky H.H., El Baz F.K., El-Baroty G.S.* Enhancement of antioxidant production in *Spirulina platensis* under oxidative stress // *Acta Physiol. Plant.* – 2009. – Vol. 31. – P. 623–631.
3. *Afiukwa C.A., Ogbonna J.C.* Effects of mixed substrates on growth and vitamin production by *Euglena gracilis* // *Afr. J. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 6. – P. 2612–2615.
4. *Carballo-Cárdenas E. C., Tuan P. M., Janssen M., Wijffels R. H.* Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation // *Biomol. Eng. J.* – 2003. – Vol. 20. – P. 139–147.
5. *Čamagajevac I. Š., Pfeiffer T. Ž., Maronić D. Š.* Abiotic stress response in plants: the relevance of tocopherols // *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants 2018.* (pp. 233-251). Springer, Cham.
6. *De Roeck-Holtzhauer Y., Quere I., Claire C.* Vitamin analysis of five planktonic microalgae and one macroalga // *J. Appl. Phycol.* – 1991. – Vol. 3. – P. 259–264.
7. *Durmaz Y.* Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation // *Aquaculture.* – 2007. – Vol. 272. – P. 717–722.
8. *Fritsche S., Wang X., Jung C.* Recent advances in our understanding of tocopherol biosynthesis in plants: an overview of key genes, functions, and breeding of vitamin E improved crops // *Antioxidants.* – 2017. – Vol. 6. – P. 1–18.
9. *Fujita T., Aoyagi H., Ogbonna J.C., Tanaka H.* Effect of mixed organic substrate on α -tocopherol production by *Euglena gracilis* in photoheterotrophic culture // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. – Vol. 79. – P. 371–378.
10. *Gissibl A., Sun A., Care A., Nevalainen H., Sunna A.* Bioproducts from *Euglena gracilis*: Synthesis and applications // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2019. – Vol. 7. – P. 108.
11. *Goiris K., Van Colen W., Wilches I., León-Tamariz F., De Cooman L., Muy-laert K.* Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae // *Algal res.* – 2017. – Vol. 7. – P. 51–57.
12. *Grimm P., Risse J.M., Cholewa D., Müller J.M., Beshay U., Friehs K., Flaschel E.* Applicability of *Euglena gracilis* for biorefineries demonstrated by the production of α -tocopherol and paramylon followed by anaerobic digestion // *J. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 215. – P. 72–79.
13. *Hasan M.T., Sun A., Mirzaei M., Te'o J., Hobba G., Sunna A., Nevalainen H.* A comprehensive assessment of the biosynthetic pathways of ascorbate, α -tocopherol and free amino acids in *Euglena gracilis* var. *saccharophila* // *Algal res.* – 2017. – Vol. 27. – P. 140–151.
14. *Häubner N., Sylvander P., Vuori K., Snoeijjs P.* Abiotic stress modifies the



- synthesis of alphanatocopherol and beta-carotene in phytoplankton species // J. Phycol. – 2014. – Vol. 50. – P. 753–759.
15. Herrero C., Abalde J., Fábregas J. β -Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources // Bioresour. Technol. – 1991. – Vol. 38. – P. 121–125.
 16. Kottuparambil S., Thankamony R.L., Agusti S. *Euglena* as a potential natural source of value-added metabolites. A review // Algal Res. – 2019. – Vol. 37. – P. 154–159.
 17. Kusmic C., Barsacchi R., Barsanti L., Gualtieri P., Passarelli V. *Euglena gracilis* as source of the antioxidant vitamin E. Effects of culture conditions in the wild strain and in the natural mutant WZSL // J. Appl. Phycol. – 1998. – Vol. 10. – P. 555–559.
 18. López-Hernández J.F., García-Alamilla P., Palma-Ramírez D., Álvarez-González C.A., Paredes-Rojas J.C., Márquez-Rocha F.J. Continuous microalgal cultivation for antioxidants production // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – P. 41–71.
 19. Maeda H., Song W., Sage T. L., Della Penna D. Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaptation and phloem loading in *Arabidopsis* // The Plant Cell. – 2016. – Vol. 18. – P. 2710–2732.
 20. Marquardt D., Williams J. A., Kučerka N., Atkinson J., Wassall S. R., Katsaras J., Harroun T. A. Tocopherol activity correlates with its location in a membrane: a new perspective on the antioxidant vitamin E // J. Amer. Chem. Soc. – 2013. – Vol. 135. – P. 7523–7533.
 21. Mendiola J.A., García-Martínez D., Rupérez F.J., Martín-Álvarez P.J., Reglero G., Cifuentes A., Barbas C., Ibanez E., Señoráns F. J. Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE // J. Supercrit. Fluids. – 2008. – Vol. 43. – P. 484–489.
 22. Mokrosnop V.M., Zolotareva E.K., Polishchuk O.V. Accumulation of α -tocopherol and β -carotene in *Euglena gracilis* cells under autotrophic and mixotrophic culture conditions // Appl. Biochem. Microbiol. – 2016. – Vol. 52. – P. 216–221.
 23. Mokrosnop V. Functions of tocopherols in the cells of plants and other photosynthetic organisms // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 86. – P. 26–36.
 24. Mudimu O., Koopmann I. K., Rybalka N., Friedl T., Schulz R., Bilger W. Screening of microalgae and cyanobacteria strains for α -tocopherol content at different growth phases and the influence of nitrate reduction on α -tocopherol production // J. Appl. Phycol. – 2017. – Vol. 29. – P. 2867–2875.
 25. Ogbonna, J.C. Microbiological production of tocopherols: current state and prospects // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. – Vol. 84. – P. 217–225.
 26. Ogbonna J.C., Tomiyama S., Tanaka H. Production of α -tocopherol by sequential heterotrophic-photoautotrophic cultivation of *Euglena gracilis* // J. Biotechnol. – 1999. – Vol. 70. – P. 213–221.
 27. O'Neill E.C., Trick M., Hill L., Rejzek M., Dusi R.G., Hamilton C.J., Zimba P.V., Henrissat B., Field R.A. The transcriptome of *Euglena gracilis* reveals unexpected metabolic capabilities for carbohydrate and natural product biochemistry // Mol. Biosyst. – 2015. – Vol. 11. – P. 2808–2820.



28. *Ruggeri B.A., Gray R.J., Watkins T.R., Tomlins R.I.* Effects of low-temperature acclimation and oxygen stress on tocopherol production in *Euglena gracilis* Z // *Appl. Environment. Microbiol.* – 1985. – Vol. 50. – P. 1404–1408.
29. *Rodríguez-Zavala J.S., Ortiz-Cruz M.A., Mendoza-Hernández G., Moreno-Sánchez R.* Increased synthesis of α -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production // *J. Appl. microbiol.* – 2010. – Vol. 109. – P. 2160–2172.
30. *Sakuragi Y., Maeda H., DellaPenna D., Bryant D.A.* α -Tocopherol plays a role in photosynthesis and macronutrient homeostasis of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 that is independent of its antioxidant function // *Plant Physiol.* – 2006. – Vol. 141. – P. 508–521.
31. *Santiago-Morales I.S., Trujillo-Valle L., Márquez-Rocha F.J., López-Hernández J.F.L.* Tocopherols, Phycocyanin and Superoxide Dismutase from Microalgae: As Potential Food Antioxidants // *Appl. Food Biotechnol.* – 2018. – Vol. 5. – P. 19–27.
32. *Shigeoka S., Onishi T., Nakano Y., Kitaoka, S.* The contents and subcellular distribution of tocopherols in *Euglena gracilis* // *Agricult. Biol. Chem.* – 1986. – Vol. 50. – P. 1063–1065.
33. *Sivakumar G., Jeong K., Lay J.O.* Biomass and RRR- α -tocopherol production in *Stichococcus bacillaris* strain siva 2011 in a balloon bioreactor // *Microb. cell factories.* – 2014. – Vol. 13. – P. 79.
34. *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. // *Biotechnol. bioeng.* – 1997. – Vol. 53. – P. 185–190.
35. *Tani Y., Tsumura H.* Screening for tocopherol-producing microorganisms and α -tocopherol production by *Euglena gracilis* Z. // *Agricult. Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 53. – P. 305–312.
36. *Tossavainen M., Lahti K., Edelmann M., Eskola R., Lampi A. M., Piironen V., Korvonen P., Ojala A., Romantschuk M.* Integrated utilization of microalgae cultured in aquaculture wastewater: wastewater treatment and production of valuable fatty acids and tocopherols // *J. Appl. Phycol.* – 2017. – Vol. 31. – P. 1753–1763.
37. *Valentin H.E., Qungang Q.* Biotechnological production and application of vitamin E: current state and prospects // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 68. – P. 436–44.
38. *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. – Vol. 15. – P. 75–80.
39. *Wang Y., Seppänen-Laakso T., Rischer H., Wiebe M.G.* *Euglena gracilis* growth and cell composition under different temperature, light and trophic conditions // *PLoS ONE.* – 2018. – Vol. 13: e0195329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195329>
40. *Yuan P., Cui S., Liu Y., Li J., Du G., Liu L.* Metabolic engineering for the production of fat-soluble vitamins: advances and perspectives // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2019. – Vol. 104. – P. 935–951.



REFERENCES

1. Abd El-baky HH, El Baz FK, El-Baroty GS. Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. Int. J. Agric. Biol. 2004; 6: 49-57.
2. Abd El-baky HH, El Baz FK, El-Baroty GS. Enhancement of antioxidant production in *Spirulina platensis* under oxidative stress // Acta Physiol. Plant. 2009; 31: 623–631.
3. Afiukwa CA, Ogbonna JC. Effects of mixed substrates on growth and vitamin production by *Euglena gracilis*. Afr. J. Biotechnol. 2007; 6: 2612-2615.
4. Carballo-Cárdenas EC, Tuan PM, Janssen M, Wijffels RH. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. Biomol. Eng. J. 2003; 20(4-6): 139-147.
5. Čamagajevac IŠ, Pfeiffer TŽ, Maronić D Š. Abiotic stress response in plants: the relevance of tocopherols. In Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants (pp. 233-251). 2018. Springer, Cham.
6. De Roeck-Holtzhauer Y, Quere I, Claire C. Vitamin analysis of five planktonic microalgae and one macroalga. J. Appl. Phycol. 1991; 3(3): 259-264.
7. Durmaz Y. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. Aquaculture. 2007; 272: 717-722.
8. Fritsche S., Wang X., Jung C. Recent advances in our understanding of tocopherol biosynthesis in plants: an overview of key genes, functions, and breeding of vitamin E improved crops. Antioxidants. 2017; 6(4): 99.
9. Fujita T, Aoyagi H, Ogbonna JC, 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.
10. Gissibl A, Sun A, Care A, Nevalainen H, Sunna A. Bioproducts from *Euglena gracilis*: Synthesis and applications. Front. Bioeng. Biotechnol. 2019; 7:108.
11. Goiris K, Van Colen W, Wilches I, León-Tamarizc F, De Cooman L, Muylaertb K. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. Algal res. 2017; 7: 51-57.
12. Grimm P, Risse JM, Cholewa D, Müller JM, Beshay U, Friehs K, Flaschel E. Applicability of *Euglena gracilis* for biorefineries demonstrated by the production of α -tocopherol and paramylon followed by anaerobic digestion. J. Biotechnol. 2015; 215: 72-79.
13. Hasan MT, Sun A, Mirzaei M, Te'o J, Hobba G, Sunna A, Nevalainen H. A comprehensive assessment of the biosynthetic pathways of ascorbate, α -tocopherol and free amino acids in *Euglena gracilis* var. *saccharophila*. Algal res. 2017; 27: 140-151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.08.029>
14. Häubner N., Sylvander P., Vuori K., Snoeijs P. Abiotic stress modifies the synthesis of alpha- tocopherol and beta- carotene in phytoplankton species. J, phycol. 2014; 50(4):753-759.
15. Herrero C, Abalde J, Fábregas J. β -Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. Bioresour Technol. 1991; 38: 121-125.



16. Kottuparambil S, Thankamony RL, Agusti S. *Euglena* as a potential natural source of value-added metabolites. A review. *Algal Res.* 2019; 37. P. 154-159.
17. Kusmic C, Barsacchi R, Barsanti L, Gualtieri P, Passarelli V. *Euglena gracilis* as source of the antioxidant vitamin E. Effects of culture conditions in the wild strain and in the natural mutant WZSL. *J. Appl. Phycol.* 1998; 10 (6):555-559.
18. López-Hernández JF, García-Alamilla P, Palma-Ramírez D, Álvarez-González CA, Paredes-Rojas JC, Márquez-Rocha FJ. Continuous microalgal cultivation for antioxidants production. *Molecules.* 2020; 25(18):41-71.
19. Maeda H, Song W, Sage TL., Della Penna D. Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaptation and phloem loading in *Arabidopsis*. *The Plant Cell.* 2016; 18(10): 2710-2732.
20. Marquardt D, Williams JA., Kučerka N, Atkinson J, Wassall SR., Katsaras J, Harroun, TA. Tocopherol activity correlates with its location in a membrane: a new perspective on the antioxidant vitamin E. *J. Amer. Chem. Soc.* 2013; 135(20): 7523-7533.
21. Mendiola JA, García-Martínez D, Rupérez FJ, Martín-Álvarez PJ, Reglero G, Cifuentes A, Barbas C, Ibanez E, Señoráns FJ. Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE. *J. Supercrit. Fluids.* 2008; 43(3):484-489.
22. Mokrosnop VM, Zolotareva EK, Polishchuk OV. Accumulation of α -tocopherol and β -carotene in *Euglena gracilis* cells under autotrophic and mixotrophic culture conditions. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016; 52. P. 216-221.
23. Mokrosnop V. Functions of tocopherols in the cells of plants and other photosynthetic organisms. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 86: 26-36.
24. Mudimu O, Koopmann IK, Rybalka N, Friedl T, Schulz R, Bilger W. Screening of microalgae and cyanobacteria strains for α -tocopherol content at different growth phases and the influence of nitrate reduction on α -tocopherol production. *J. Appl. Phycol.* 2017; 29(6):2867-2875.
25. Ogbonna JC. Microbiological production of tocopherols: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 84(2):217-225.
26. Ogbonna JC, Tomiyama S, Tanaka H. Production of α -tocopherol by sequential heterotrophic-photoautotrophic cultivation of *Euglena gracilis*. *J. Biotechnol.* 1999; 70: 213-221.
27. O'Neill EC, Trick M, Hill L, Rejzek M, Dusi RG, Hamilton CJ, Zimba PV, Henrissat B, Field RA. The transcriptome of *Euglena gracilis* reveals unexpected metabolic capabilities for carbohydrate and natural product biochemistry. *Mol. BioSyst.* 2015; 11 (10):2808-2820.
28. Ruggeri BA, Gray RJ, Watkins TR, Tomlins RI. Effects of low-temperature acclimation and oxygen stress on tocopheron production in *Euglena gracilis*. *Z. Appl. Environm. Microbiol.* 1985; 50(6): 1404-1408.
29. Rodríguez-Zavala JS, Ortiz-Cruz MA, Mendoza-Hernández G, Moreno-Sánchez R. Increased synthesis of α - tocopherol, paramylon and tyrosine



- by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. J. Appl. Microbiol. 2010; 109(6): 2160-2172.
30. Sakuragi Y, Maeda H, Della Penna D, Bryant DA. α -Tocopherol plays a role in photosynthesis and macronutrient homeostasis of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 that is independent of its antioxidant function. Plant Physiol. 2006; 141: 508–521.
 31. Santiago-Morales IS, Trujillo-Valle , Márquez-Rocha FJ, López-Hernández JF. Tocopherols, Phycocyanin and Superoxide Dismutase from Microalgae: As Potential Food Antioxidants. Appl. Food Biotechnol. 2018; 5, 19–27.
 32. Shigeoka S, Onishi T, Nakano Y, Kitaoka S. The contents and subcellular distribution of tocopherols in *Euglena gracilis*. Agricult. Biol. Chem. 1986; 50(4): 1063-1065.
 33. Sivakumar G, Jeong K, Lay JO. Biomass and RRR- α -tocopherol production in *Stichococcus bacillaris* strain siva2011 in a balloon bioreactor. Microb. cell factories. 2014; 13(1):79.
 34. 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. Biotechnol. Bioeng. 1997; 53(2):185-190.
 35. Tani Y, Tsumura H. Screening for tocopherol-producing microorganisms and α -tocopherol production by *Euglena gracilis* Z. Agricult. Biol. Chem. 1989; 53(2), 305-312.
 36. Tossavainen M, Lahti K, Edelmann M, Eskola R, Lampi A. M, Piironen V, Korvonen P, Ojala A, Romantschuk M. Integrated utilization of microalgae cultured in aquaculture wastewater: wastewater treatment and production of valuable fatty acids and tocopherols. J. Appl. Phycol. 2017; 31(3): 1753-1763.
 37. Valentin HE, Qungang Q. Biotechnological production and application of vitamin E: current state and prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005; 68: 436-444.
 38. 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; 15(1): 75-80.
 39. Wang Y, Seppänen-Laakso T, Rischer H, Wiebe MG. *Euglena gracilis* growth and cell composition under different temperature, light and trophic conditions. PLoS ONE. 2018; 13(4): e0195329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195329>
 40. Yuan P, Cui S, Liu Y, Li J, Du G, Liu L. Metabolic engineering for the production of fat-soluble vitamins: advances and perspectives. Applied Microbiol. Biotechnol. 2019; 104(3):935-951.

Стаття надійшла до редакції 27.01.2021 р.

