

ROBERT DULIŃSKI

## WYBRANE ASPEKTY BIOTECHNOLOGICZNEJ PRODUKCJI KAROTENOIDÓW

### Streszczenie

Przez ostatnie kilkanaście lat obserwuje się rosnące zainteresowanie alternatywnymi metodami pozyskiwania witamin. Jest to odpowiedź na produkcję żywności wysoko przetworzonej, często pozbawionej tych niezbędnych dla funkcjonowania organizmu składników, jak również poszukiwanie możliwości rozwiązania problemu niedoborów żywności w krajach rozwijających się. Zagadnienie dotyczy szczególnie witaminy A oraz jej prekursorów, których deficyt w diecie może skutkować wadami wzroku, a nawet prowadzić do śmierci.

Celem pracy było przybliżenie strategii związanych z mikrobiologiczną syntezą karotenoidów m.in. w komórkach *Escherichia coli* oraz wybranych gatunkach mikroalg i grzybów. Zastosowanie metod mikrobiologicznej produkcji tych nutraceutyków powoduje obniżenie kosztów, zmniejszenie ilości odpadów, wydatkowanej energii, jak również pozwala na wykorzystanie nowych surowców, takich jak nietypowe cukry pochodzące z odpadów przemysłu owocowo-warzywnego czy oleje roślinne. W artykule przedstawiono też strategie inżynierii genetycznej stosowane w modyfikacji ścieżki biosyntezy karotenoidów w tkankach roślinnych zmierzające do akumulacji wybranych związków oraz zagadnienia związane z ich biodostępnością w uzyskanych produktach. Omówienie procesów produkcji karotenoidów poprzedzono charakterystyką najważniejszych właściwości i walorów żywieniowych witaminy A oraz jej karotenoidowych prekursorów. Szczególną uwagę zwrócono na zagadnienia dotyczące selekcji szczepów oraz warunków hodowli mikroalg jako nadproducentów karotenoidów, jak również procesów transformacji komórek roślinnych w celu uzyskania bogatych w prowitaminę A odmian roślin, na przykładzie projektu „Złoty ryż” oraz perspektyw jego rozwoju.

**Słowa kluczowe:** karotenoidy,  $\beta$ -karoten, witamina A, rośliny transgeniczne, „Złoty ryż”

### Witamina A oraz karotenoidy

Rozległa literatura dotycząca  $\beta$ -karotenu dowodzi wysokiego zainteresowania witaminą A oraz jej prekursorami – karotenoidami w kontekście aspektów biomedycznych oraz żywieniowych [11, 14, 19, 40, 47].

---

*Dr hab. R. Duliński, Katedra Biotechnologii Żywności, Wydz. Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 31-149 Kraków. Kontakt: r.dulinski@ur.krakow.pl*

Odkrycia witaminy A dokonał Elmer McCollum na Uniwersytecie Yale w 1900 roku w trakcie badań nad wysokobiałkową i węglowodanową, a równocześnie pozbawioną olejów oraz masła dietą szczurów doświadczalnych, która prowadziła do śmierci gryzoni. Zidentyfikowano wówczas tzw. czynnik A, który później nazwano witaminą A. Struktura witaminy A została wyjaśniona w latach 1929 - 1931 przez Paula Karrera, laureata nagrody Nobla, po ekstrakcji związku z olejów pochodzących z wątroby halibuta i makreli. Witamina A dostaje się do organizmu w formie prekursora – najistotniejszego pod względem biologicznym –  $\beta$ -karotenu (prowitamina A,  $C_{40}H_{56}$ ). Proces metaboliczny konwersji karotenoidów z prowitaminy A do aktywności retinoli jest prowadzony poprzez utlenianie i symetryczny rozkład cząsteczki, reakcja jest katalizowana przez enzym 15,15'-monoksygenazę- $\beta$ -karotenu (EC 1.13.11.21) [23].

### **Struktura chemiczna**

Karotenoidy to grupa terpenów, blisko 700 strukturalnie spokrewnionych związków, z których 10 % obecnych jest w znaczących ilościach w przyrodzie, a ponad 20 zidentyfikowano w ludzkim osoczu [45]. Występują głównie w roślinach, glonach, bakteriach i grzybach. Są zbudowane z 8 podjednostek izoprenoidowych, formalnie to pochodne likopenu powstałe w wyniku reakcji uwodornienia, odwodornienia, utlenienia czy cyklizacji cząsteczki [46]. Karotenoidy są znane jako pomarańczowo-czerwone barwniki występujące w takich roślinach, jak: marchew, pomarańcze, pomidory oraz w żółtych barwnikach wielu kwiatów. Charakterystycznym elementem jest wspomniany łańcuch polienowy o długości 3 - 15 podjednostek, co wpływa na spektrum absorpcji oraz barwę związku. W wielu przypadkach w warzywach i tkankach aktywnych fotosyntetyczne chlorofile maskują ciemnopomarańczową barwę produktów bogatych w karotenoidy (np. w pokrzywie, *Urtica dioica* L.) [27].

### **Funkcje**

Źródłem witaminy A w diecie są przede wszystkim: (1) estry retinyli, retinolu (2)  $\alpha$ - i  $\beta$ -karoten, kryptoksantina. Szeroka grupa związków pełni rozliczne funkcje zarówno pod względem żywieniowym, jak i zastosowań w przemyśle spożywczym w aspekcie technologicznym [5, 7, 13, 14]. Karotenoidy są wykorzystywane m.in. do barwienia margaryny, masła, soków owocowych i piwa, zup, produktów mleczarskich, deserów i sałatek, syropów, mięsa oraz past. Należą do najważniejszych barwników roślinnych. Odgrywają kluczową rolę w definiowaniu parametrów jakościowych owoców i warzyw, a w ochronie przed degradacją fotooksydacyjną wykazują korelację z właściwościami przeciwutleniającymi w żywieniu i organizmie człowieka.

Szacunkowa wartość rocznej produkcji karotenoidów w 2019 roku będzie wynosiła 1,8 mld USD [44]. Związki te są wprowadzane do żywności w ilościach 2 ÷ 50 ppm jako barwniki, z czego zaledwie 2 % całkowitej ilości wykorzystywanej

w przemyśle spożywczym pochodzi z ekstrakcji naturalnych źródeł. Warto zaznaczyć, że naturalne karotenoidy charakteryzuje bezpieczeństwo wynikające m.in. ze statusu GRAS (ang. *Generally Recognized as Safe*) przyznanego mikroorganizmom, z których są pozyskiwane, przez Agencję ds. Żywności i Leków USA (ang. Food and Drug Administration, FDA).

Za pomocą barwnika E160B, otrzymywanego naturalnie z nasion drzewa tropikalnego arnoty właściwej (annatto) biksyny i norbiksyny, nadaje się barwę takim produktom, jak: margaryny, dekoracje i polewy na słodczykach, pieczywo i wyroby ciastkarskie, lody, likiery, sery topione (aromatyzowane lub z dodatkami smakowymi), sery dojrzewające, ryby wędzone oraz aromatyzowane płatki śniadaniowe [48] (tab. 1).

Tabela 1. Przykłady zastosowania wybranych karotenoidów roślinnych  
Table 1. Examples of application of selected plant carotenoids

Roślina / Plant	Karotenoidy Carotenoids	Zastosowanie Application
Korzeń marchwi / Carrot root	Karoteny, głównie $\beta$ -karoten Carotenes, mainly $\beta$ -carotene	Suplement diety Diet supplement
Drzewko orleańskie ( <i>Bixa orellana</i> L.) Orleana eve ( <i>Bixa orellana</i> L.)	Biksyna, norbiksyna (annatto) Bixin, norbixin (annatto)	Barwnik spożywczy Food dye
Owoc <i>Capsicum annum</i> <i>Capsicum annum</i> fruit	Kapsantyna, kapsorubina (papryka) Capsanthin, capsorubin (peeper)	Barwienie żywności Food colouring
Płatki <i>Crocus sativus</i> Petals of <i>Crocus sativus</i>	Krocyna, krocetyna Crocin, crocethin	Suplement diety Diet supplement
Owoc pomidora / Tomato fruit	Likopen / Lycopene	Suplement diety Diet supplement
Olej palmowy / Palm oil	Karoteny / Carotenes	Suplement diety, barwnik Diet supplement, colourant

Źródło / Source: opracowanie własne na podstawie [13, 39, 41, 44] / the author's own study based on [13, 39, 41, 44]

### Aspekty kliniczne

Karotenoidy wpływają na obniżenie ryzyka wystąpienia choroby wieńcowej, nowotworów, dystrofii mięśniowej. Likopen redukuje ryzyko pojawienia się raka prostaty [17, 42]. Zeaksantyna i luteina to związki, które chronią przed skorelowanym z wiekiem zwyrodnieniem plamki żółtej oka, ponadto niedobór  $\beta$ -karotenu i  $\beta$ -kryptokszantyny może prowadzić do ślepoty zmierzchowej [5, 23, 55].

Globalne występowanie niedoborów witaminy A w populacji na podstawie danych opublikowanych przez Światową Organizację Zdrowia w 2015 roku wskazuje, że u blisko 19,0 mln dzieci w wieku przedszkolnym i 19,1 mln kobiet w ciąży odnotowano poziomy stężenia retinolu poniżej 0,7  $\mu\text{mol/l}$ , co stanowi dolną granicę normy, po-

niżej której diagnozuje się niedobór witaminy A. Problem jest rozpowszechniony zwłaszcza w krajach rozwijających się, w których produkt krajowy brutto (PKB) jest mniejszy niż 15 000 USD rocznie (ok. 90 % ludności na świecie).

## Metody produkcji

### *Synteza chemiczna*

Pierwsza synteza chemiczna witaminy A została przeprowadzona przez Holendrów Arensa i van Dorpa w latach 1946 - 1947 w przedsiębiorstwie Organon International. Synteza chemiczna karotenoidów to wciąż główny sposób pozyskiwania tych bioaktywnych substancji, a rynek zdominowany jest przez duże koncerny chemiczne [4]. Koszt pozyskiwania substratów do syntezy jest wysoki, co stanowi barierę dla potencjalnych nowych producentów. Wielkość produkowanej, głównie chemicznie, witaminy A wynosi 2700 t rocznie (Hoffmann-La Roche, BASF, Rhône-Poulenc), a  $\beta$ -karotenu – 400 t/rok, (Hoffmann-La Roche, BASF) [16, 17]. Wprowadzane w ostatnich latach techniki enkapsulacji lub innej formy inkorporacji syntetycznego  $\beta$ -karotenu, np. do ziaren ryżu, mogą być pewną alternatywą dla biotechnologicznych metod wzmacniania produkcji w roślinach oraz fitofarmingu [47].

### *Mikrobiologiczna produkcja karotenu – warunki hodowli*

Jedną z pierwszych mikrobiologicznych produkcji karotenu na skalę przemysłową przeprowadzono w 1966 roku na terenie dawnego ZSRR. Od tego czasu znacznie udoskonalono zarówno same szczepy mikroorganizmów, jak i warunki ich hodowli oraz pozyskiwania końcowych produktów. Najbardziej wydajne szczepy to gatunki mikroalg, drożdży oraz grzybów: *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella*, *Pfaffia rhodozyma*, *Dunaliella salina*, *Rhodotorula glutinis* czy *Blakeslea trispora* [1, 31, 43]. Należy podkreślić przewagę prowadzenia procesu metodami mikrobiologicznej syntezy nad tradycyjną technologią syntezy chemicznej wynikającą m.in. z:

- 1) niższych kosztów produkcji. Np. cena syntetycznego związku do wytworzenia astaksantyny kształtuje się na poziomie 1000 - 2500 USD w stosunku do 500 – 700 USD w przypadku produktu pozyskiwanego z biomasy mikroalg czy 250 USD – ekstrahowanego z komórek grzybów [18];
- 2) podwyższenia potencjalnych korzyści zdrowotnych z uwagi na obecność w produktach aktywnych pochodnych, takich jak: luteina, zeaksantyna, wiolaksantyna czy astaksantyna [14, 45];
- 3) rosnących kosztów syntezy chemicznej wynikających z wyczerpywania się źródeł surowców ropopochodnych oraz toksyczności wykorzystywanych półproduktów (toluen, aceton, pirydyna) [38, 43].

W optymalnych warunkach hodowli mikroalg stężenie soli (siarczanu chininy) powinno utrzymywać się na maksymalnym dopuszczalnym poziomie ( $18 \div 27 \%$ ), aby

zminimalizować rozwój orzęsków i ameb [39, 43]. Do hodowli kontrolowanej w ograniczonym zakresie wykorzystywane są stawy o powierzchni  $5 \div 250$  ha. Hodowla intensywna dotyczy akwenów o pow.  $3000 \text{ m}^2$ , w których niwelowanie gradientu stężenia substancji odżywczych następuje przy użyciu mieszadeł łopatkowych pracujących z niewielką intensywnością, aby ograniczyć efekt uszkodzenia komórek mikroalg. Wydajność hodowli to ok. 9 kg karotenu dziennie z akwakultury o powierzchni ok. 1 ha. Proces akumulacji karotenoidów stymulowany jest w warunkach stresu środowiskowego wywołanego przez zmianę warunków świetlnych czy m.in. takich parametrów, jak: zasolenie, pH, zawartość składników odżywczych (m.in. fosforanów i azotanów) [30, 49]. Proces wymusza na komórkach gromadzenie zapasów karotenoidów stanowiących swoistą tarczę ochronną dla nadmiernej energii wydzielanej w wyniku fotosyntezy.

Proces oczyszczania otrzymanego produktu obejmuje takie techniki preparatywne, jak: flokulacja, adsorpcja powierzchniowa (siarczanem(VI) glinu, siarczanem(VI) żelaza(III), chlorkiem żelaza(III)) lub wirowanie w wirówkach z przepływem ciągłym, ( $1 \text{ m}^3/\text{h}$ ,  $5 \div 15\,000$  rpm). Końcowy produkt przyjmuje postać pasty zawierającej  $20 \div 40$  % s.m., w której obecne są inne karotenoidy (do 15 %), m.in. luteina, zeaksantyna, kryptoksantyna [9, 18]. Karotenoidy są bardzo labilne i w trakcie procesu suszenia rozpyłowego produktu finalnego konieczny jest dodatek przeciwutleniaczy, który zapewnia ochronę przed utlenianiem i izomeryzacją (izomer cis- $\beta$ -karotenu jest znacznie skuteczniejszy w prewencji raka, co wykazano w badaniach na szczurach) [22]. Metody pozyskiwania karotenoidów udoskonalono poprzez zastosowanie dezintegracji komórek ultradźwiękami oraz wprowadzenie surfaktantów, m.in. metylosulfotlenku, w procesie oczyszczania [51].

Nowe alternatywne źródła substratów, takie jak olej buriti pozyskiwany z palmy *Mauritia flexuosa* i wykorzystanie lipolitycznych szczepów *Thermomyces lanuginosus* (immobilizowane komórki) oraz *Yarrowia lipolytica* (płynne) przy zastosowaniu kriokoncentracji, odkwaszania (usunięcie 70 % wolnych kwasów tłuszczowych) i wspomaganą etanolem ekstrakcji pozwalają na uzyskanie zawartości karotenoidów na poziomie 3,9 ppm [43].

W porównawczej analizie transkryptomu *H. pluvialis* w odniesieniu do procesu biosyntezy astaksantyny w odpowiedzi na monochromatyczne czerwone (660 nm) oraz niebieskie (450 nm) światło emitowane przez diody LED wykazano, że promieniowanie to stanowi kolejny czynnik, który umożliwia zwiększenie mikrobiologicznej produkcji tego karotenoidu [28]. Transformacja genu desaturazy fitoenu (EC 1.3.99.31) w chloroplastach *H. pluvialis* pod kontrolą promotora psbA/UTR pozwoliła na zwiększenie akumulacji astaksantyny w komórkach o blisko 67 % [16]. Astaksantyna, której koszt pozyskania z *Haematococcus* wynosi 552 USD/kg, została zaaprobowana w Japonii do konsumpcji jako naturalny czerwony barwnik żywności i pigment pasz

w żywieniu ryb [35, 43]. Również amerykańska Agencja Żywności i Leków oraz Kanadyjska Agencja Inspekcji Żywności (ang. Canadian Food Inspection Agency, CFAI), podobnie jak kilka krajów europejskich, zaakceptowały użycie tego pigmentu jako dodatku do karmy dla łososi oraz aktualnie również jako suplementu diety.

Inny przykład mikrobiologicznej produkcji karotenoidów to kofermentacja szczepu *Rhodotorula glutinis* 22P z bakteriami kwasu mlekowego [15, 20]. W tym przypadku jest to naturalny substrat zawierający laktozę (permeat po ultrafiltracji serwatki). W mikсотroficznej kulturze odnotowano akumulację głównie  $\beta$ -karotenu, torulenu oraz torularodyny. Szczep nie przyswaja laktozy, ale łatwo przyswaja glukozę oraz galaktozę, dlatego kofermentacja następuje z bakteriami rodzaju *Lactobacillus* (*L. halveticus* 12A).

Typowe warunki hodowli są następujące:

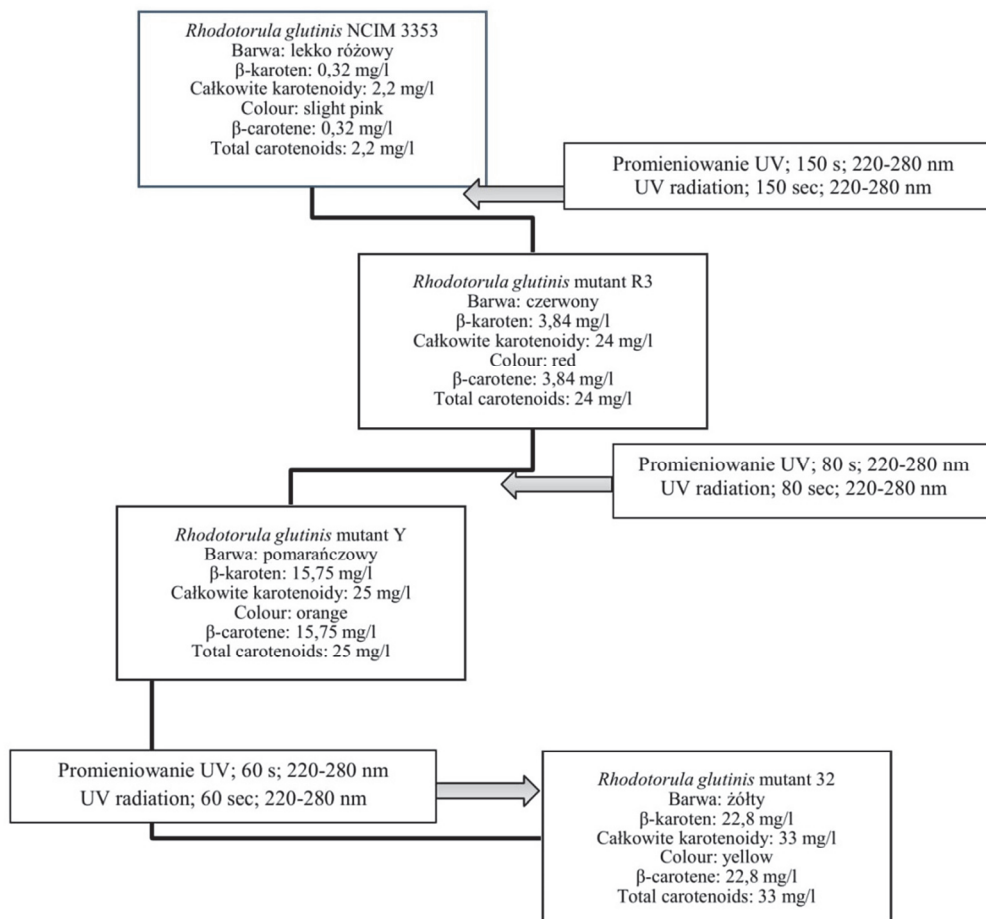
- temperatura 30 °C, pH 6,0,
- napowietrzanie: 0,55 l powietrza/l pożywki/min,
- mieszanie: 220 rpm, 7 dni hodowli,
- maksymalna produkcja egzopolisacharydów (8,2 g/l): 4. dzień hodowli,
- akumulacja karotenoidów (263 mg/g s.m. komórek): 6. dzień, faza stacjonarna.

Alternatywną metodą stosowaną do zwiększania produkcji związków karotenoidowych jest wykorzystanie czynników mutagennych, np. promieniowania UV, którego krótkie cykle pozwalają na wyselekcjonowanie wysokowydajnych szczepów (rys. 1) [21, 37].

Szczep *Rhodotorula* charakteryzuje się największym potencjałem produkcji karotenoidów: torulenu oraz torularodyny, które mogą być wykorzystywane jako barwniki oraz przeciwutleniacze w przemyśle spożywczym [26].

### **Genetyczna modyfikacja ścieżki biosyntezy karotenoidów – problemy i strategie**

Zasadnicze problemy w modyfikacji szlaku biosyntezy karotenoidów stanowią prekursorzy, które są zużywane do rozszerzenia istniejących ścieżek metabolicznych [13, 28, 47]. Kolejna kwestia to zapewnienie magazynowania w komórkach produktu, zwłaszcza jeśli jest on lipofilny tak jak karotenoidy. Proste związki izoprenoidowe są równocześnie substratami do syntezy tokoferoli, fitohormonów oraz pochodnych karotenoidowych [8, 10, 13, 14, 56].

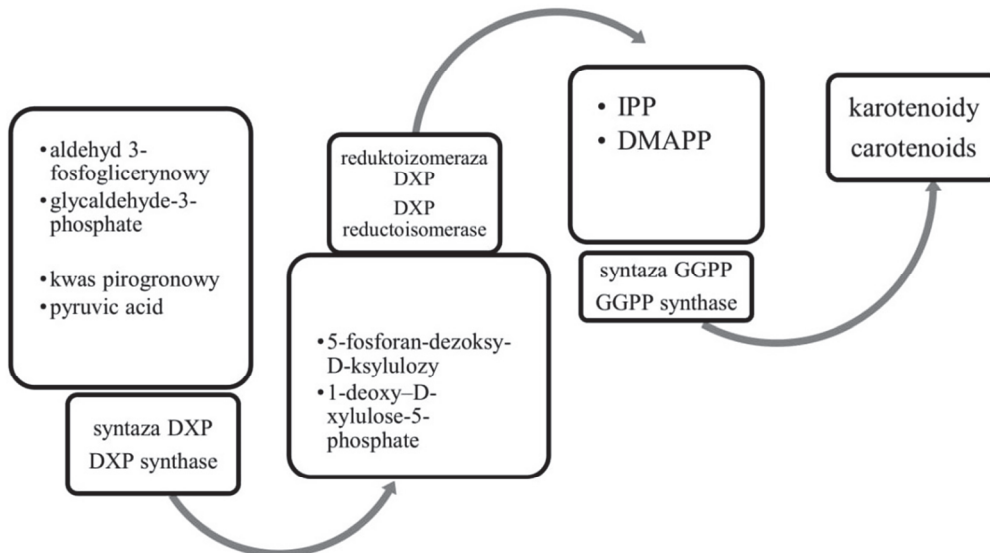


Rys. 1. Przykładowy schemat procedury udoskonalania szczepu *Rhodotorula glutinis* w celu zwiększenia produkcji karotenoidów

Fig. 1. Example scheme of *Rhodotorula glutinis* strain improving procedure for the purpose of increasing carotenoid production

Źródło / Source: opracowanie własne na podstawie [20, 21] / the author's own study based on [20, 21]

*Escherichia coli* to wygodny gospodarz dla heterologicznej produkcji karotenoidów. Większość genów karotenoidowych z bakterii, grzybów i roślin wyższych może podlegać funkcjonalnej ekspresji w komórkach tej bakterii. Na rys. 2. przedstawiono wczesne etapy biosyntezy karotenoidów. Należy zwrócić uwagę, że ścieżka bakteryjna i roślinna syntezy izoprenoidów jest odmienna od ścieżki biosyntezy u zwierząt (prekursor – kwas mewalonowy) [53].



Objaśnienia / Explanatory notes:

DXP – 5-fosforan 1-dezoksy-D-ksylulozy / 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate; IPP – pirofosforan izopentyli / isopentenyl pyrophosphate, DMAPP – pirofosforan dimetyloallilu / dimetyloallil diphosphate, GGPP – pirofosforan geranogeranylu / geranogeranyl pyrophosphate

Rys. 2. Wczesne etapy biosyntezy karotenoidów w transformowanych komórkach *E. coli*

Fig. 2. Early stages of carotenoids biosynthesis in transformed *E. coli* cells

Źródło / Source: opracowanie własne na podstawie [44, 49, 53] / the author's own study based on [44, 49, 53]

Problem dostarczania prekursorów może być rozwiązany po zastosowaniu inżynierii metabolicznej ścieżki 5-fosforanu-dezoksy-D-ksylulozy, która zwiększy poziom pirofosforanu izopentyli – prekursora biosyntezy większości karotenoidów. W tym celu poddano transformacji komórki bakteryjne i uzyskano nadekspresję:

- syntazy 5-fosforanu 1-dezoksy-D-ksylulozy (EC 2.2.1.7),
- reduktoizomerazy 1-dezoksy-D-ksylulozofosforanu (EC 1.1.1.267),
- izomerazy fosforanu izopentyli (EC 5.3.3.2).

W efekcie odnotowano stymulację karotenogenezy 3,5-krotnie wobec macierzystego szczepu bakteryjnego do końcowej wydajności 1,5 mg  $\beta$ -karotenu/g suchej masy komórek [44].

Stosunkowo nowa strategia w odniesieniu do komórek *E. coli* to tzw. inżynieria membranowa, gdzie karotenoidy, podobnie jak wiele związków lipofilnych, mogą być akumulowane poprzez nadekspresję integralnych białek błonowych: podjednostki b ATPazy czy receptora chemotaksji Tsr oraz poszerzenie powierzchni i struktury błon. Zastosowanie tej strategii zapewniło deponowanie  $\beta$ -karotenu w rekombinowanym szcze-



pie *E. coli* CAR025, na poziomie 44,2 mg/g, co stanowi wzrost o 39 % w stosunku do macierzystego szczepu [56].

### **Transgeniczne rośliny**

Obecnie znane są trzy strategie zwiększania poziomu karotenoidów w tkankach roślin:

- 1) modyfikacja szlaku biosyntezy w celu jego przesunięcia do kolejnego produktu karotenoidowego, np. w pomidorze (*Lycopersicon esculentum*),
- 2) zwiększenie zawartości istniejących karotenoidów, np. w rzepaku (*Brassica napus*),
- 3) inżynieria ścieżki karotenogenezy w tkankach kompletnie pozbawionych karotenoidów, np. endosperma ryżu (*Oryza sativa*).

Te strategie można jeszcze uzupełnić angielskimi terminami: „push” (strategia 1), „block” oraz „sink”, co w przypadku tych dwóch ostatnich technik projektowania oznacza blokowanie lub wyłączanie szlaków metabolicznych prowadzących m.in. do biosyntezy konkurencyjnych produktów, takich jak tokoferole [3, 32].

W przypadku pomidora (*Lycopersicon esculentum*) zasadniczym produktem macierzystych odmian jest likopen, który stanowi ok. 75 ÷ 80 % całkowitej zawartości karotenoidów [19], co wynika m.in. z negatywnej regulacji ekspresji dwóch genów cyklicznej likopenu (EC 5.5.1.18) (*Lcy-b* i *Lcy-e*) na końcowym etapie dojrzewania owocu. W tym przykładzie oczywistym wyborem jest strategia „push”, zmierzająca do cyklizacji liniowego prekursora w kierunku biosyntezy  $\alpha$ - oraz  $\beta$ -karotenu. W wyniku procesów transgenezy, m.in. poprzez nadekspresję genu cyklicznej likopenu, wprowadzono linie pomidora bogate w  $\beta$ -karoten (żółta barwa owoców) oraz jego cykliczne pochodne akumulujące 130 ÷ 200  $\mu\text{g}$   $\beta$ -karotenu/g s.m. (‘Red Setter’, ‘HighCaro’) [6]. Skuteczny mechanizm transformacji zapewniły m.in. wybór silnego konstytutywnego promotora CaMV 35S, wykorzystanie sekwencji cDNA *Lcy-b* oraz wytypowanie do transformacji odmiany ‘Red Setter’, komercyjnej, wyselekcjonowanej linii o dużej zawartości karotenoidów w owocach.

Ostatnia ścieżka modyfikacji (strategia 3) wynika z analizy danych FAO/WHO oraz innych raportów żywieniowych, według których to trzy ziarna zbóż: ryżu, kukurydzy i pszenicy, czyli tzw. „staple food”, wspólnie zapewniają ponad 50 % energii dla globalnej populacji, przy czym są stosunkowo ubogie w witaminy oraz składniki odżywcze. Ten deficyt jest szczególnie niebezpieczny w przypadku niedoboru witaminy A [35]. Jednocześnie w pewnych strefach klimatycznych, m.in. w Afryce Subsaharyjskiej, z uwagi na uwarunkowania agronomiczne dominujące areale mogą stanowić uprawy manioku czy bananów (*Musa* spp.), np. w Ugandzie, gdzie triploidalny genom tej rośliny posłużył naukowcom, przy wsparciu fundacji Billa i Melindy Gatesów, do selekcji oraz modyfikacji ścieżki karotenogenezy. Ostatnia faza projektu (2012 - 2017)

początkowo obejmowała uzyskanie całkowitej liczby 200 niezależnych linii transgenicznych odmian „M9” i „Nakitembe” MtPsy2a, które mogą akumulować blisko 20  $\mu\text{g}$   $\beta$ -karotenu/g tkanki [39].

### „Złoty ryż” i co dalej

Ryż (*Oryza sativa*) to istotne źródło białek i energii charakteryzujące się znaczącym niedoborem mikroelementów oraz prekursorów witaminy A. Stanowi główny składnik diety w krajach rozwijających się. W Azji 70 % dzieci choruje z powodu niedoboru witaminy A, 1 ÷ 2 mln dzieci może uniknąć śmierci w wieku 1 - 4 lat dzięki dostarczeniu wymaganej dawki tej witaminy [55]. Nawet jeśli program rządowy zaleca fortyfikację ryżu witaminą A, to często nie dociera on do biedniejszych regionów, gdzie ryż podlega ręcznej obróbce i hodowcy dysponują własnym ziarnem. Łuskanie ziaren ryżu wiąże się z usuwaniem warstwy aleuronowej bogatej w tłuszcze, celem zahamowania procesu jęlczenia, bardzo prawdopodobnego zwłaszcza w strefie tropikalnej i subtropikalnej. Jednocześnie łuskany biały ryż nie zawiera praktycznie prowitaminy A, natomiast w nieprzemielonym brązowym ryżu obecne są znaczące pod względem żywieniowym ilości witaminy B<sub>1</sub>, żelaza, wapnia, ale już tylko śladowe ilości prowitaminy A (0,1  $\mu\text{g}$ /g ziarna) [37].

Wymienione przyczyny i alarmujące dane stanowiły wystarczający impuls do zaprojektowania odmiany ryżu, która byłaby w stanie zaspokoić przynajmniej część zapotrzebowania na witaminę A, głównie w społeczeństwach azjatyckich. Przy wsparciu fundacji Rockefellera i po przejściu komercyjnej ścieżki przez firmę Syngenta, zainicjowano badania na Uniwersytecie we Freiburgu (Peter Beyer) oraz w Politechnice Federalnej w Zurychu (Ingo Potrykus) [2, 24, 35]. Pierwotnie sugerowano, że problemem „Złotego ryżu” może być stosunkowo mała biodostępność prowitaminy. Przykładowo współczynnik konwersji w owocach wynosi 6 : 1, a parametr ten w przypadku szpinaku ma wartość 24 : 1, co przejawia się ubogim wchłanianiem witaminy A w procesie trawienia [14]. W badaniach dzieci w wieku szkolnym, które spożywały „Złoty ryż”, szpinak lub czysty  $\beta$ -karoten w kapsułkach oleju wykazano jednak, że  $\beta$ -karoten w „Złotym ryżu” został przekonwertowany do retinolu równie skutecznie jak w preparacie podawanym jako suplement i skuteczniej nawet niż  $\beta$ -karoten obecny w szpinaku [14].

W celu zwiększenia zawartości prowitaminy testowano produkcję karotenu z odmian transgenicznych, w których źródłowe geny pochodziły nie tylko z żonkila (*Narcissus pseudonarcissus*), ale i z sałaty, papryki czy kukurydzy i właśnie te ostatnie transgeny (ZmPSY i PaCrtI) okazały się najbardziej efektywne. W rezultacie, w roku 2006 powstał projekt „Golden Rice 2” [49]. W ramach prac badawczych udało się pozyskać odmiany, które akumulowały w bielmie ryżu blisko 30  $\mu\text{g}$   $\beta$ -karotenu/g, co stanowi wynik blisko 20-krotnie lepszy niż początkowe rezultaty pierwszej edycji pro-

jektu (1999 - 2002). Odpowiedzi na tak spektakularny wzrost należy szukać w mechanizmach ekspresji genu syntazy fitoenu (PSY, EC: 2.5.1.32). Enzym ten występuje w tkankach roślinnych w postaci kilku izoenzymów *psy1*, *psy2*, *psy3*, których struktura III-rzędowa to tylko nieznaczne różnice w sekwencji pojedynczych aminokwasów (1-2 aa w pozycji 168 oraz 257). Odmiany z izoenzymem *psy1*, zidentyfikowane w kukurydzy tworzą różne typy globularnych lub fibrylarnych plastoglobul [49], które mogą kierować biosyntezę karotenoidów do alternatywnych subkomórkowych lokalizacji, co w istotny sposób wpływa na proces magazynowania oraz powiązaną z nim biodostępność karotenoidów.

W ocenie biodostępności warto wspomnieć badania Lipkiego i wsp. [30], w których analizie poddano transgeniczne sorgo. Oznaczono obecność kilkakrotnie większej puli karotenoidów w bielmie ziarna odmiany modyfikowanej genetycznie:  $3,1 \div 14 \mu\text{g}$   $\beta$ -karotenu/g s.m. (włączając izomery  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten,  $\alpha$ -kryptoksantynę, i  $\beta$ -kryptoksantynę) w stosunku do  $0,9 \div 1,5 \mu\text{g/g}$  s.m. w nietransgenicznym ziarnie. Za pomocą badania symulującego trawienie *in vitro* wykazano jednak, że karotenoidy z tego biofortyfikowanego ziarna sorga były mniej dostępne niż z ziaren pozyskanych z odmiany dzikiej [30]. Jedną z możliwych interpretacji otrzymanych wyników jest wiązanie karotenoidów przez białka kafiryny obecne w bielmie sorga, co utrudnia proces ich uwolnienia z matrycy.

Kolejne problemy w programie „Złotego ryżu” to jego uprawa polowa oraz wpływ deficytu prekursora GGPP na syntezę innych substancji, dla których jest substratem, np. kwasu giberelinowego czy innych fitohormonów [12, 46]. Osobnym problemem jest konieczność przeprowadzenia kosztochłonnych i długotrwałych badań niezbędnych do zaakceptowania produktu przez międzynarodowe agencje, przy stosunkowo sceptycznym podejściu części opinii publicznej [38, 51].

## Podsumowanie

W ostatnich kilkunastu latach odnotowuje się rosnące zapotrzebowanie na karotenoidy jako substancje barwiące, składniki biofarmaceutyków czy też kosmetyków. Zdecydowana większość produkcji jest nadal realizowana metodami chemicznymi, chociaż dynamiczny rozwój inżynierii genetycznej pozwala na konstruowanie odmian roślin i udoskonalanie szczepów mikroorganizmów nadprodukujących czy też akumulujących karotenoidy w ilościach  $20 \div 40 \mu\text{g/g}$  tkanki lub biomasy. Pierwszoplanowym przykładem tej technologii jest omówiony projekt „Złoty ryż”, aczkolwiek przedsięwzięcie to jest równocześnie najlepszą ilustracją ograniczeń technologii GM w produkcji żywności funkcjonalnej. Pomimo kilkunastu lat badań i wysiłku dużej grupy naukowców projekt nadal jest w fazie wdrożenia z uwagi na aspekty prawne.

*Projekt finansowany w ramach Grantu MNiSW na działalność statutową.*

## Literatura

- [1] Asker D.: High throughput screening and profiling of high-value carotenoids from a wide diversity of bacteria in surface seawater. *Food Chem.*, 2018, 261, 103-111.
- [2] Beyer P., Al-Babili S., Ye X., Lucca P., Schaub P., Welsch R., Potrykus I.: Golden Rice: Introducing the beta-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *J. Nutr.*, 2002, 132, 506S-510S.
- [3] Binod P., Sindhu R., Pandey A.: Production of vitamins. *Compr. Food Ferment. Biotechnol.*, 2010, II, 959-980.
- [4] Cataldo V.F., López J., Cárcamo M., E. Agosin E.: Chemical vs. biotechnological synthesis of C13-apocarotenoids: Current methods, applications and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 100, 5703-5718.
- [5] Chew B.P., Park J.S.: Carotenoid Action on the Immune Response. *J. Nutr.* 2004, 134 (1), 257S-261S.
- [6] D'Ambrosio C., Stigliani A.L., Giorio G.: Food from genetically engineered plants: Tomato with increased  $\beta$ -carotene, lutein, and xanthophylls contents. In: *Genetically Modified Organisms in Food. Production, Safety, Regulation and Public Health*. Eds. R.R. Watson and V.R. Preedy. Academic Press, San Diego 2016, pp. 361-380.
- [7] Davinelli S., Nielsen M.E., Scapagnini G.: Astaxanthin in skin health, repair, and disease: A comprehensive review. *Nutrients*, 2018, 10, 1-12.
- [8] DellaPenna D.: A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. *J. Plant Physiol.*, 2005, 162, 729-737.
- [9] Dey S., Rathod V.K.: Ultrasound assisted extraction of  $\beta$ -carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrasound. Sonochem.*, 2013, 20, 271-276.
- [10] Duliński R.: Biotechnologiczne metody produkcji witamin z wykorzystaniem mikroorganizmów. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, 1 (68), 5-19.
- [11] During A., Harrison E.H.: Mechanisms of provitamin A (carotenoid) and vitamin A (retinol) transport into and out of intestinal Caco-2 cells. *J. Lipid Res.*, 2007, 48, 2283-2294.
- [12] Van Eenennaam A.L., Lincoln K., Durrett T.P., Valentin H.E., Shewmaker C.K., Thorne G.M., Jiang J., Baszisz 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, 15, 3007-3019.
- [13] Farré G., Bai C., Twyman R.M., Capell T., Christou P., Zhu C.: Nutritious crops producing multiple carotenoids – A metabolic balancing act. *Trends Plant Sci.*, 2011, 16, 532-540.
- [14] Fernández-García E., Carvajal-Lérida I., Jarén-Galán M., Garrido-Fernández J., Pérez-Gálvez A., Hornero-Méndez D.: Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Res. Int.*, 2012, 46, 438-450.
- [15] Frengova G.I., Beshkova D.M.: Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: Yeasts of biotechnological importance. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 36, 163-180.
- [16] Galarza J.I., Gimpel J.A., Rojas V., Arredondo-Vega B.O., Henríquez V.: Over-accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* through chloroplast genetic engineering. *Algal Res.*, 2018, 31, 291-297.
- [17] Gammone M.A., Pluchinotta F.R., Bergante S., Tettamanti G., D'Orazio N.: Prevention of cardiovascular diseases with carotenoids. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2017, 9, 165-171.
- [18] Gong M., Bassi A.: Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnol. Adv.*, 2016, 34, 1396-1412.
- [19] Hernández-Almanza A., Montañez J., Martínez G., Aguilar-Jiménez A., Contreras-Esquivel J.C., Aguilar C.N., Lycopene: Progress in microbial production. *Trends Food Sci. Technol.*, 2016, 56, 142-148.
- [20] Hernandez-Almanza A., Montanez J.C., Aguilar-Gonzalez M.A., Martmez-Avila C., Rodriguez-Herrera R., Aguilar C.N.: *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Biosci.*, 2014, 5, 64-72.

- [21] Hernández-Almanza A., Navarro-Macias V., Aguilar O., Aguilar-González M.A.: Carotenoids extraction from *Rhodotorula glutinis* cells using various techniques: A comparative study. *Ind. J. Exp. Biol.*, 2017, 55, 479-484.
- [22] Herrero M., del Pilar Sánchez-Camargo A., Cifuentes A., Ibáñez E.: Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2015, 71, 26-38.
- [23] Hong S.H., Kim K.R., Oh D.K.: Biochemical properties of retinoid-converting enzymes and biotechnological production of retinoids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 99, 7813-7826.
- [24] Jauhar P.P.: Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: The prospects and challenges. *Crop Sci.*, 2006, 46, 1841-1859.
- [25] Kadam S.U., Prabhasankar P., Freitas A.C.: Proximate composition and nutritional value of three macroalgae: *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*. *Food Res. Int.*, 2017, 99, 986-994.
- [26] Kot A.M., Błazejak S., Gientka I., Kieliszek M., Bryś J.: Torulene and torularhodin: „New” fungal carotenoids for industry? *Microb. Cell Fact.*, 2018, 17, 1-14.
- [27] Lakshman M.R.: Functions and actions of retinoids and carotenoids: Building on the vision of James Allen Olson carotene oxygenases: A new family of double bond cleavage enzymes. *Am. Soc. Nutr. Sci.*, 2004, 16, 246-250.
- [28] Lee C., Ahn J.-W., Kim J.-B., Kim J.Y., Choi Y.-E.: Comparative transcriptome analysis of *Haematococcus pluvialis* on astaxanthin biosynthesis in response to irradiation with red or blue LED wavelength. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, 34, 96.
- [29] De Lima J.G., Brito-Oliveira T.C., de Pinho S.C., Brito-Oliveira T.C.: Characterization and evaluation of sensory acceptability of ice creams incorporated with beta-carotene encapsulated in solid lipid microparticles. *Food Sci. Technol.*, 2016, 36, 664-671.
- [30] Lipkie T.E., de Moura F.F., Zhao Z.-Y., Albertsen M.C., Che P., Glassman K., Ferruzzi M.G.: Bioaccessibility of carotenoids from transgenic provitamin A biofortified sorghum. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61, 5764-5771.
- [31] Liu L., Pohnert G., Wei D.: Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential. *Mar. Drugs.*, 2016, 14, 191.
- [32] Lorenzo J.M., Agregán R., Munekata P.E.S.: Proximate composition and nutritional value of three macroalgae: *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*. *Mar. Drugs.*, 2017, 15, 1-11.
- [33] Nigam P.S., Luke J.S.: Food additives: Production of microbial pigments and their antioxidant properties. *Curr. Opin. Food Sci.*, 2016, 7, 93-100.
- [34] Ogbonna J.C.: Microbiological production of tocopherols: Current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 84, 217-225.
- [35] Ola M.S., Nawaz M.I., Siddiquei M.M., Al-Amro S., Abu El-Asrar A.M.: Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic retinopathy. *J. Diabetes Complications*, 2012, 26, 56-64.
- [36] Orosa M., Franqueira D., Cid A., Abalde J.: Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.*, 2005, 96, 373-378.
- [37] Paine J.A., Shipton C.A., Chaggar S., Howells R.M., Kennedy M.J., Vernon G., Wright S.Y., Hinchliffe E., Adams J.L., Silverstone A.L., Drake R.: Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nat. Biotechnol.*, 2005, 23, 482-487.
- [38] Parker G.L., Smith L.K., Baxendale I.R.: Development of the industrial synthesis of vitamin A. *Tetrahedron*, 2016, 72, 1645-1652.
- [39] Paul J.-Y., Harding R., Tushemereirwe W., Dale J.: Banana21: From gene discovery to deregulated Golden Bananas. *Front. Plant Sci.*, 2018, 9, 558.
- [40] Perrier V., Dubreucq E., Galzy P.: Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Arch. Microbiol.*, 1995, 164, 173-179.
- [41] Potrykus I.: Lessons from the „Humanitarian Golden Rice” project: Regulation prevents development of public good genetically engineered crop products. *N. Biotechnol.*, 2010, 27, 466-472.

- [42] Revuelta J.L., Ledesma-Amaro R., Santos M.A., Jiménez A.: Microbial production of vitamins. Woodhead Publishing Ltd, Oxford 2013.
- [43] Ribeiro B.D., Barreto D.W., Coelho M.A.Z.: Technological aspects of  $\beta$ -carotene production. Food Bioprocess Technol., 2011, 4, 693-701.
- [44] Saini R.K., Keum Y.S.: Progress in microbial carotenoids production. Ind. J. Microbiol., 2017, 57, 129-130.
- [45] Saini R.K., Nile S.H., Park S.W.: Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. Food Res. Int., 2015, 76, 735-750.
- [46] Sanchez S., Ruiz B., Rodríguez-Sanoja R., Flores-Cotera L.B.: Microbial production of carotenoids. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge 2013.
- [47] Sauvant P., Cansell M., Hadj Sassi A., Atgié C.: Vitamin A enrichment: Caution with encapsulation strategies used for food applications. Food Res. Int., 2012, 46, 469-479.
- [48] Shahid-ul-Islam, Rather L.J., Mohammad F.: Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications – A review. J. Adv. Res., 2016, 7, 499-514.
- [49] Shumskaya M., Wurtzel E.T.: The carotenoid biosynthetic pathway: Thinking in all dimensions. Plant Sci., 2013, 208, 58-63.
- [50] Tian L.: Carotenoids, genetically modified foods, and vitamin A nutrition. In: Genetically Modified Organisms in Food. Production, Safety, Regulation and Public Health. Eds. R.R. Watson and V.R. Preedy. Academic Press, San Diego 2016, pp. 353-360.
- [51] Urnau L., Colet R., Soares V.F., Franceschi E., Valduga E., Steffens C.: Extraction of carotenoids from *Xanthophyllomyces dendrorhous* using ultrasound-assisted and chemical cell disruption methods. Can. J. Chem. Eng., 2018, 96, 1377-1381.
- [52] Waldenstedt L., Inbarr J., Hansson I., Elwinger K.: Effects of astaxanthin-rich algal meal (*Haematococcus pluvalis*) on growth performance, caecal campylobacter and clostridial counts and tissue astaxanthin concentration of broiler chickens. Anim. Feed Sci. Technol., 2003, 108, 119-132.
- [53] Wang C., Zada B., Wei G., Kim S.W.: Metabolic engineering and synthetic biology approaches driving isoprenoid production in *Escherichia coli*. Bioresour. Technol., 2017, 241, 430-438.
- [54] Wessler J., Zilberman D.: Golden Rice: No progress to be seen. Do we still need it? Environ. Dev. Econ., 2017, 22, 107-109.
- [55] West K.P.: Extent of vitamin A deficiency among preschool children and women of reproductive age. J. Nutr., 2002, 132 (9), 2857S-2866S.
- [56] Wu T., Ye L., Zhao D., Li S., Li Q., Zhang B., Bi C., Zhang X.: Membrane engineering – A novel strategy to enhance the production and accumulation of  $\beta$ -carotene in *Escherichia coli*. Metab. Eng., 2017, 43, 85-91.
- [57] Zhang Y., Liu Z., Sun J., Xue C., Mao X.: Biotechnological production of zeaxanthin by microorganisms. Trends Food Sci. Technol., 2018, 71, 225-234.

## SELECTED ASPECTS OF BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF CAROTENOIDS

### Summary

Over the past several years there is observed a growing interest in alternative methods of producing vitamins. This is a response to the production of highly processed food often devoid of those essential for the functioning of the body substances; also it is a search of the solutions to the problem of food shortages in the developing countries. This issue refers, in particular, to the vitamin A and its carotenoid precursors, the deficiency of which in the diet may result in visual impairment and even lead to death.

The objective of the research study was to present the strategies associated with the microbiological synthesis of carotenoids, which takes place, among other things, in *Escherichia coli* cells and in some selected species of microalgae and fungi. The application of microbiological methods in the production of those nutraceuticals results in the cost reduction, decrease in the waste quantities and energy expenditure

cut; also it makes it possible to use new raw materials, such as atypical sugars derived from the fruit and vegetable processing industry by-products or vegetable oils. In the paper, there were also presented genetic engineering strategies used to modify a carotenoid biosynthesis pathway in plant tissues and targeted at accumulating selected compounds as were the issues related to their bioavailability in the products produced. The discussion on the carotenoid production processes was preceded by the characteristic of the most important properties and nutritional values of vitamin A and its carotenoid precursors. Particular attention was paid to both the issues referring to the selection of strains and the conditions of microalgae cultures as carotenoid overproducers and the plant cell transformation processes intended for obtaining plant varieties rich in provitamin A; the whole was exemplified by the "Golden Rice" project and prospects for its development.

**Key words:** carotenoids,  $\beta$ -carotene, vitamin A, transgenic plants, "Golden Rice" ☒



Politechnika Łódzka



Komitet Nauk o Żywności i Żywieniu Polskiej Akademii Nauk,  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej,  
Polskie Towarzystwo Technologów Żywności – Oddział Łódzki

zapraszają na:

**XLIV Sesję Naukową Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu PAN**  
**„Nauka, technologia i innowacje w żywności i żywieniu”**

Łódź, 3 - 4 lipca 2019 r.

Informacje: <http://pan.binoz.p.lodz.pl/>

Kontakt: dr inż. Joanna Oracz - sekretarz; tel. 42 631-34-62;

e-mail: [pan.binoz@info.p.lodz.pl](mailto:pan.binoz@info.p.lodz.pl)