

LAS MICROALGAS COMO PRODUCTORAS DE PIGMENTOS CON INTERÉS COMERCIAL

*Miguel G. Guerrero, Herminia Rodríguez, M. Angeles Vargas,
Mercedes García-González, José Antonio del Campo, José Moreno y
Joaquín Rivas.*

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla-CSIC

INTRODUCCIÓN

La consecución de sistemas de microalgas efectivos en la generación de carotenoides y ficobiliproteínas constituye un aspecto central en la actual biotecnología de microalgas. La identificación de muy diversas aplicaciones para estos compuestos, han conducido al establecimiento de diversas compañías especializadas en su producción comercial.

En este trabajo se presentan, en forma resumida, los logros y potenciales de las microalgas como fuente de pigmentos de interés comercial.

CAROTENOIDES

Los carotenoides, son pigmentos liposolubles isoprenoides, presentes en todos los organismos fotosintéticos, cuyo color va del amarillo al rojo. Según su naturaleza química se dividen en dos grupos principales: carotenos y xantofilas, estas últimas derivados oxigenados del caroteno que contienen uno o más grupos funcionales (acetilénico,

glicosídico, epoxídico, cetónico, hidroxílico, éster, carboxílico, etc.) (Spurgeon y Porter, 1980; Cohen, 1986; Rowan, 1989; Goodwin, 1992).

En las microalgas los carotenoides pueden encontrarse en las membranas tilacoidales de los cloroplastos o en el interior de cuerpos lipídicos, fuera de los mismos (Siefermann-Harms, 1987; Yong y Lee, 1991; Bidigare *et al.*, 1993). Estos pigmentos desempeñan papeles críticos en la fotosíntesis, tanto de tipo estructural como funcional. Actúan como pigmentos accesorios que capturan la energía de la luz entre 400 y 500 nm, no absorbida eficientemente por la clorofila, canalizándola hasta este último pigmento (Siefermann-Harms, 1987). Por otro lado, desarrollan una función de fotoprotección, previniendo la fotooxidación, ya que atenúan o desenergetizan especies reactivas de oxígeno, así como la clorofila en estado excitado (Siefermann-Harms, 1987; Young y Lee, 1991; Bidigare *et al.*, 1993). También se ha propuesto otro proceso implicado en la fotoprotección, el ciclo de las xantofilas, mediante el cual el exceso de energía de la clorofila se disipa en forma de calor, a través de una interconversión entre distintas xantofilas (Taylor, 1996; Eskling *et al.*, 1997; Gilmore, 1997). Respecto a un papel estructural de los carotenoides, éstos parecen ayudar a mantener la integridad tridimensional de los complejos fotosintéticos dentro de las membranas tilacoidales, ya que ciertos carotenoides, como la luteína, se requieren para el adecuado ensamblaje de los complejos captadores de luz (Plumley y Schmidt, 1987; Taylor, 1996). Por otro lado, también se ha descrito un papel de los carotenoides en fototropismo y fototaxia (Hagen *et al.*, 1993).

De los más de 600 carotenoides conocidos, sólo un número reducido se utiliza comercialmente. Entre estos se encuentran β -caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina, criptoxantina, zeaxantina y luteína. La limitación en el número de carotenoides disponibles comercialmente se debe a la dificultad y elevado costo de su síntesis, más que a una falta de aplicación práctica. Las aplicaciones comerciales de los carotenoides son variadas. Se emplean como colorantes en industrias alimentarias. Algunas xantofilas, como luteína, cantaxantina y astaxantina se utilizan como aditivos en piensos para incrementar la pigmentación de pollos y yemas de huevos, así como para aumentar la fertilidad del ganado. También se

utilizan en acuicultura para incrementar el color de salmónidos y crustáceos. Los carotenoides tienen también aplicación en la industria cosmética (Cohen, 1986; Borowitzka M.A., 1988; Harvey, 1988).

Por otro lado, se han descrito diversas propiedades terapéuticas para los carotenoides. Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que un alto consumo de carotenoides en la dieta disminuye el riesgo de contraer determinadas enfermedades asociadas con la formación de radicales libres. Entre dichas enfermedades se encuentran diversos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas y otros procesos degenerativos asociados con el envejecimiento. El β -caroteno, así como otros carotenoides, tales como α -caroteno y criptoxantina, es precursor de la vitamina A. Sin embargo, ciertos estudios han demostrado que es el consumo de β -caroteno y no de vitamina A preformada el que se correlaciona con una menor incidencia de cáncer. Además, otros carotenoides que no son precursores de la vitamina A, como la cantaxantina, también se han propuesto como agentes preventivos de dicha enfermedad. Se cree que el papel antioxidante de los carotenoides podría ser responsable de su acción anti-cáncer. El β -caroteno también se utiliza en el tratamiento médico de diversas enfermedades de la piel, en enfermedades hereditarias relacionadas con la síntesis del grupo hemo y además estimula la respuesta inmune. Por otro lado, se ha demostrado que el β -caroteno natural posee mayor poder antioxidante que el sintético. Esto se debe a que el β -caroteno natural contiene una mezcla, aproximadamente en la misma proporción, de los isómeros *cis* y *trans*, mientras que el sintético está compuesto sólo por el isómero *trans*. Estudios nutricionales indican la acumulación preferente en el hígado de la mezcla de esteroisómeros sobre el β -caroteno sintético. De hecho, el β -caroteno natural se comercializa a aprox. 1000-2000 \$ USA Kg⁻¹, alrededor del doble del precio del sintético. Con respecto a las xantofilas, además del papel propuesto como agentes preventivos del cáncer para algunas de ellas, cabe resaltar la posible función de la luteína y la zeaxantina en la región macular de la retina como secuestradores de oxígeno singlete y como filtros de luz azul. De hecho, el consumo de luteína y zeaxantina se ha correlacionado con una disminución del riesgo de cataratas y de enfermedades degenerativas de la retina relacionadas con

el envejecimiento (Ben-Amotz y Avron, 1990; Edge *et al.*, 1997; VERIS, 1997).

La mayoría de los carotenoides utilizados comercialmente se obtienen mediante síntesis química. Los seis carotenoides sintéticos de importancia comercial son: β -apocarotenal, éster etílico del ácido β -apo-8'-carotenoico, citranaxantina, β -caroteno, cantaxantina y astaxantina. Los precios en el mercado actual para polvos que contienen 5-10% de carotenoide son 600 \$ USA Kg⁻¹ para el β -caroteno, 900 \$ para los apocarotenoides, 1300 \$ para la cantaxantina y 2500 \$ para la astaxantina. El mercado mundial estimado durante 1996 para astaxantina, cantaxantina y β -caroteno fue de 380 millones \$ USA para los sintéticos y de 120 para los de origen biológico. Para el año 2000 se prevee un incremento considerablemente superior (alrededor de tres veces) para el mercado de los carotenoides de fuentes biológicas al de los sintéticos (Pfander, 1992; Johnson y Schroeder, 1995).

El incremento en el uso comercial de carotenoides naturales durante los últimos años se debe a las regulaciones, cada vez más restrictivas, sobre el uso de aditivos sintéticos en la industria alimentaria y al gran desarrollo de la acuicultura. Todo ello ha impulsado el desarrollo del cultivo de microalgas para la obtención de carotenoides, habiéndose registrado numerosas patentes. Sin embargo, en la actualidad, sólo dos microalgas unicelulares clorofíceas son fuentes comerciales reconocidas de carotenoides: la microalga flagelada halofílica *Dunaliella salina*, que acumula β -caroteno y el alga verde de agua dulce *Haematococcus pluvialis* que acumula astaxantina (Borowitzka M.A., 1992; Johnson y Schroeder, 1995).

Dunaliella es capaz de crecer en condiciones extremas, tolerando alta salinidad e irradiancia y puede acumular β -caroteno hasta alcanzar un 14% del peso seco (Ben-Amotz y Avron, 1990; Richmond, 1990; Borowitzka M.A., 1992). La máxima acumulación de β -caroteno por esta microalga tiene lugar a altas salinidades, irradiancias y temperaturas, así como bajo condiciones de limitación de nutrientes, especialmente nitrógeno (Ben-Amotz y Avron, 1989; Borowitzka M.A., 1992). Se han obtenido mutantes de *Dunaliella* capaces de acumular β -caroteno a baja

irradiancia, así como otros superproductores de β -caroteno, resistentes a irradiancias muy altas. También se han descrito mutantes con menores requerimientos de sal para la acumulación de β -caroteno (Ben-Amotz y Shaish, 1992; Borowitzka L.J., 1992; Zamir, 1992; Johnson y Schroeder, 1995).

Las condiciones extremas requeridas para la producción de β -caroteno por *Dunaliella* permiten que se pueda cultivar a la intemperie con fines comerciales en sistemas abiertos simples, sin agitación o agitados por paletas. Se han establecido plantas de producción para el cultivo de esta microalga como fuente de β -caroteno en Australia, Estados Unidos e Israel. Las dos industrias australianas, Western Biotechnology Ltd. y Betatene Ltd., utilizan sistemas de cultivo extensivo muy simples, con estanques de 5 a más de 50 Ha. La velocidad de crecimiento y la densidad celular son muy bajas en estos sistemas. Sin embargo, los bajos costes del terreno y de la sal (ya que aprovechan salinas naturales), el clima favorable y los sistemas de recogida de células muy eficientes, hacen que esta tecnología simple resulte rentable. Las industrias americanas (Microbio Resources Inc.; Nutrilite Products Inc., N.P.I. y Cyanotech Co.) y la israelí (Nature Beta-Technology, N.B.T.) se basan en cultivos intensivos en estanques agitados mediante paletas. Los mayores costes de producción con estos sistemas (estanques de cultivo más complejos, mayor precio del terreno y la no utilización de salinas naturales) se ven compensados por las mayores productividades conseguidas (Richmond, 1990; Borowitzka L.J., 1992; Borowitzka M.A., 1992).

El β -caroteno de *Dunaliella* se comercializa actualmente de dos formas: cápsulas o tabletas del alga desecada, como suplemento dietético; y extracto de β -caroteno en aceite, que contiene del 1,5 al 30% de β -caroteno, para su uso como colorante alimentario en sustitución del β -caroteno sintético. En los últimos años el sector de mayor expansión en la comercialización del β -caroteno ha sido como suplemento dietético, sólo o en combinación con otros antioxidantes y vitaminas (Ben-Amotz y Avron, 1990; Borowitzka L.J., 1992).

Haematococcus es un alga biflagelada, que pierde la movilidad y forma aplanosporas provistas de una gruesa pared en condiciones desfavorables de crecimiento. Este cambio morfológico va acompañado por la acumulación de grandes cantidades de astaxantina en la región que rodea al núcleo, llegando a acumular hasta un 5% del peso seco de esta xantofila, en su mayor parte esterificada. En cultivos estancos de *Haematococcus* las células móviles predominan durante la fase exponencial de crecimiento, mientras que las aplanosporas ricas en astaxantina se forman en la fase estacionaria. La carotenogénesis se induce bajo condiciones de estrés ambiental o nutricional que inhiben la división celular, tales como alta irradiancia, limitación de fosfato y exceso de NaCl, así como alta temperatura. Algunos autores han descrito que la limitación de nitrógeno estimula la acumulación de astaxantina, mientras que otros indican que se requiere a concentraciones no limitantes. *Haematococcus* puede crecer mixotrófica y heterotróficamente, incrementándose la acumulación de astaxantina en presencia de acetato en el medio, especialmente en combinación con Fe²⁺ o con otros compuestos generadores de especies reactivas de oxígeno (metil viológeno, azul de metileno, H₂O₂, etc.). Se ha sugerido que el estrés oxidativo está implicado en la activación de la biosíntesis de astaxantina en aplanosporas inducidas por acetato (Boussiba y Vonshak, 1991; Kobayashi *et al.*, 1993, 1997; Tjahjono *et al.*, 1994).

Uno de los principales problemas en la producción comercial de astaxantina por *Haematococcus* es el lento crecimiento de esta microalga, combinado con la aparente necesidad de que los cultivos se lleven a cabo en régimen estanco, lo que alarga considerablemente el proceso. Por todo ello, se están llevando a cabo investigaciones orientadas a: 1) inducir la formación de astaxantina antes de que las células pasen al estado de aplanosporas, acortándose así el tiempo de cultivo; 2) incrementar la velocidad de crecimiento y la densidad celular alcanzada antes de la formación de aplanosporas; y 3) obtener estirpes con mayor contenido en astaxantina por selección, mutagénesis o ingeniería genética. En este sentido, se ha conseguido la producción de astaxantina en *E. coli*, tras la introducción de genes de *H. pluvialis* y de *Erwinia uredovora* implicados

en la biosíntesis de este carotenoide (Borowitzka M.A., 1992; Kajiwara et al., 1995; Breitenbach et al., 1996).

La empresa Microbio Resources Inc., en California, ha desarrollado un proceso para la producción comercial de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*. Los cultivos se realizan en estanques abiertos, agitados por paletas, de 2,6 a 4500 m². Sin embargo, el principal problema de estos sistemas parece ser la contaminación, ya que las condiciones de cultivo para *Haematococcus* son menos selectivas que las de *Dunaliella*. Por ello, los sistemas de cultivo cerrados parecen más apropiados para *Haematococcus*. Dentro de este tipo de sistemas de cultivo, los fotobiorreactores tubulares, que parecen ser los más efectivos, se están ensayando en distintos países (Richmond, 1990; Chaumont y Therpenier, 1995). La compañía Cyanotech Corp. cultiva *Haematococcus pluvialis* para la producción de astaxantina combinando sistemas abiertos y cerrados y comercializando dicho carotenoide en forma de un polvo rojo con el nombre de "NatuRose" para su uso en acuicultura y avicultura. La astaxantina es la principal fuente de pigmentación en salmónidos y crustáceos y por tanto debe suministrarse en su dieta en acuicultura. Actualmente la mayor parte de la astaxantina se obtiene mediante síntesis química, aunque el proceso es bastante complejo. El precio de la astaxantina natural es de 2000 \$ USA Kg⁻¹, comparable al de la astaxantina sintética (Johnson y Schroeder, 1995).

Aunque sólo *Dunaliella* y *Haematococcus* se reconocen actualmente como fuentes comerciales de carotenoides, existen otras microalgas que acumulan carotenoides de interés, constituyendo fuentes potenciales de estos pigmentos. Se ha descrito que ciertas microalgas pertenecientes a los géneros *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Chlamydomonas* y *Spongiococcum*, acumulan luteína bajo determinadas condiciones de cultivo. La luteína es una fuente importante de pigmentación en avicultura y acuicultura, existiendo un mercado para este carotenoide en Estados Unidos de unos 150 millones de dólares al año. Hoffmann-La Roche ha patentado la producción de luteína por *Chlorella pyrenidosa*, cultivada a 35 C. Mediante tratamiento con luz U.V. se han obtenido mutantes superproductores de esta xantofila. Otras microalgas acumulan

cantaxantina y/o astaxantina en respuesta a deficiencias nutricionales u otras condiciones de estrés, tales como deficiencia de nitrógeno y alta intensidad de luz. Entre estas microalgas se encuentran algunas estirpes de *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*, *Coelastrum* y *Dictyococcus*. La cantaxantina está aprobada como aditivo alimentario en EE.UU. y 35 otros países. El alga verde *Dictyococcus cinnabarinus* se ha ensayado para la producción comercial de cantaxantina en condiciones de limitación de nitrógeno, aunque presenta los inconvenientes de su lento crecimiento y baja producción (Theriault, 1965; Nelis y DeLeenher, 1989, 1991; Arad *et al.*, 1993; Rise *et al.*, 1994; Farrow y Tabenkin, 1996).

Nuestro grupo en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (Universidad de Sevilla-CSIC) ha llevado a cabo un estudio con distintas estirpes de algas clorofíceas, con objeto de seleccionar aquellas con alto contenido en carotenoides de interés comercial y rápido crecimiento. Se han identificado varias estirpes de interés, entre las que cabe destacar a *Muriellopsis* sp., aislada de la marisma del Empordá en Cataluña, con alto contenido en luteína (hasta 35 mg l⁻¹), rápido crecimiento (alrededor de 3 h) y alta densidad celular alcanzada en los cultivos. Para esta estirpe se han determinado las condiciones óptimas de producción de luteína, que en general coinciden con las condiciones óptimas de crecimiento. Por otro lado, se ha encontrado que condiciones de estrés, tales como valores extremos de pH o altas temperaturas, incrementan considerablemente el nivel celular de luteína en esta microalga. Experimentos preliminares llevados a cabo en cultivo continuo a la intemperie en un fotobiorreactor tubular cerrado de 55 l de capacidad y 2,2 m² de superficie han arrojado datos de producción de luteína por *Muriellopsis* de alrededor de 170 mg m⁻² día⁻¹ en primavera y de 46 mg m⁻² día⁻¹ en invierno, valores similares a los obtenidos en *Haematococcus* para la producción de astaxantina (Chaumont y Thepenier, 1995).

FICOBILIPROTEÍNAS

Las ficobiliproteínas son pigmentos antena fotosintéticos, solubles en agua, característicos de cianobacterias (algas verde-azuladas), algas rojas y criptofíceas. Las ficobiliproteínas pueden dividirse en tres clases

principales, en base a sus características espectrales: ficoeritrina (roja), ficocianina (azul) y aloficocianina (verde-azulada). La ficoeritrocianina, un cuarto tipo de ficobiliproteína, sustituye a veces a la ficoeritrina en los complejos captadores de luz. En cianobacterias y algas rojas, las ficobiliproteínas se ensamblan en agregados macromoleculares llamados ficobilisomas, que se encuentran unidos a la cara externa de las membranas fotosintéticas en contacto con el PSII. La ruta de transferencia de energía en los ficobilisomas es: ficoeritrina → ficocianina → aloficocianina → clorofila. Los cromóforos o grupos prostéticos de las ficobiliproteínas son tetrapirroles de cadena abierta llamados ficobilinas, que se unen covalentemente por uno o dos enlaces tioéter a las apoproteínas. Existen cuatro tipos de ficobilinas: ficocianobilina, ficoeritrobilina, ficourobilina y criptoviolina (Mörschel *et al.*, 1980; Glazer, 1987; Mac Coll y Guard-Friar, 1987; Stevens y Nierzwicki-Bauer, 1991).

Las ficobiliproteínas se utilizan como colorantes naturales en las industrias alimentaria y cosmética, como sustitutos de los colorantes sintéticos. La C-ficocianina de la cianobacteria *Spirulina* se comercializa por la empresa japonesa Dainippon Ink & Chemicals con el nombre de "Linablue" a alrededor de 100 \$ USA Kg⁻¹. El producto es un polvo azul no tóxico y sin olor, ligeramente dulce, de color azul brillante y con una débil fluorescencia roja en agua (Dainippon Ink and Chemicals, 1980, 1981; Cohen, 1986; Borowitzka M.A., 1988; Richmond, 1990; Becker, 1994).

Las ficobiliproteínas también poseen efectos terapéuticos. Se ha descrito que la ficocianina estimula el sistema inmune, protegiendo a los organismos frente a una variedad de enfermedades (cáncer, úlceras y otras enfermedades). En este sentido se han llevado a cabo experimentos en Japón con ratones con cáncer de hígado. Los resultados demostraron que el suplemento de extractos de ficocianina en la dieta aumentó la supervivencia. Se ha registrado una patente japonesa por Dainippon Ink and Chemicals and Tokyo Kenkyukai sobre el consumo de ficocianina de *Spirulina* como agente antitumoral y para el tratamiento de úlceras. Por otro lado, ciertos estudios realizados con *Synechococcus* y *Spirulina* han

revelado que las ficobiliproteínas (ficocianina y aloficocianina) se comportan como eficaces factores de crecimiento para el cultivo “in vitro” de células de mamíferos (Dainippon Ink and Chemicals and Tokyo Kenkyukai, 1983; Henrikson, 1989).

Las ficobiliproteínas en general, pero especialmente la ficoeritrina, han encontrado aplicaciones adicionales en inmunoensayos y microscopía de fluorescencia para diagnósticos e investigación biomédica, presentando numerosas ventajas en comparación con los marcadores fluorescentes tradicionales. Además, las ficobiliproteínas pueden conjugarse a una serie de biomoléculas, como anticuerpos y hormonas que les confieren especificidad (phycofluors), sin alteraciones significativas en las características de absorción y emisión de luz. También se han construido conjugados de ficobiliproteínas en tándem con nuevas propiedades fluorescentes. Así, uniendo covalentemente la aloficocianina a la ficoeritrina, la energía absorbida por la ficoeritrina en la región verde-azulada del espectro visible se transfiere eficientemente a la aloficocianina, que emite luz en el rojo. Esta gran separación entre la absorción y la emisión es muy valiosa en microscopía de fluorescencia. Varias compañías americanas (Cyanotech Corporation y Biomeda Corporation) suministran ficobiliproteínas puras para su uso como marcadores fluorescentes, a precios de varios miles de dólares por Kg (Glazer y Stryer, 1984; Kronick, 1986; Perdomo, 1986; MacColl y Guard-Friar, 1987; Callegari, 1989).

Las microalgas más utilizadas como fuentes comerciales de ficobiliproteínas son la cianobacteria *Spirulina* y el alga roja *Porphyridium*. *Spirulina* es una cianobacteria filamentosa sin heterocistos, no fijadora de nitrógeno. Sus filamentos son móviles y de forma helicoidal, aunque su morfología puede variar según las condiciones de cultivo. *Spirulina* se encuentra en numerosos hábitats, pudiendo crecer en ambientes extremos, como ciertos lagos alcalinos de América Central y África, ya que tolera amplios márgenes de salinidad y pH, estando su óptimo de temperatura en torno a los 35°C. Habitualmente se cultiva a altos valores de pH y altas concentraciones de NaCl, a fin de disminuir los riesgos de contaminación de los cultivos (Richmond, 1986).

La producción comercial de *Spirulina* en la actualidad se lleva a cabo en Méjico, Taiwan, Tailandia, Estados Unidos (California y Hawai) y Japón. La producción mundial alcanza las 1000 toneladas al año. Las condiciones locales determinan los sistemas de cultivo idóneos, así como la fuente de nutrientes. Generalmente se cultiva en estanques abiertos, poco profundos, agitados por paletas, de dimensiones entre 500 y 5000 m², aunque también puede cultivarse en fotobiorreactores cerrados. Actualmente la mayor parte de la producción mundial de *Spirulina* se destina a su uso como alimento dietético o alimentación animal. La biomasa de *Spirulina* como alimento dietético se comercializa a alrededor de 100 \$ USA Kg⁻¹, en diversas formas como cápsulas y tabletas (Richmond, 1990).

Porphyridium es un alga unicelular, que puede formar colonias irregulares rodeadas de un mucílago. Este material mucilaginoso es excretado por las células al medio y consiste en un polisacárido sulfatado polianiónico soluble en agua. Esta microalga tolera amplios márgenes de temperatura, irradiancia, salinidad y pH, encontrándose en una gran diversidad de hábitats: aguas dulces, salobres o marinas, superficies de suelos húmedos y en invernaderos. Aunque el potencial de esta microalga como productora de compuestos de interés se conoce desde hace más de 20 años, se han llevado a cabo pocos cultivos en masa. *Porphyridium* se cultiva a pequeña y mediana escala en EE.UU., Francia e Israel, tanto en fotobiorreactores cerrados como en estanques abiertos, ya que puede mantenerse durante periodos largos sin contaminación significativa. Entre los productos de interés que se obtienen de *Porphyridium* se encuentran las ficobiliproteínas, fundamentalmente la ficoeritrina, polisacáridos y ácido araquidónico. Las empresas americanas Biomeda Corp. y Cyanotech Corp. comercializan las ficobiliproteínas de *Porphyridium* como marcadores fluorescentes a varios miles de dólares el Kg (Richmond, 1986; Vonshak, 1988).

Las cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno son también excelentes fuentes potenciales de ficobiliproteínas. En la mayoría de las cianobacterias, las ficobiliproteínas constituyen hasta un 20% del peso seco, siendo la C-ficocianina la ficobiliproteína mayoritaria. Algunas

estirpes, sin embargo, son particularmente ricas en C-ficoeritrina (7-10% del peso seco). Además presentan la ventaja de no requerir nitrógeno combinado en el medio de cultivo, lo que disminuye los costes de producción y reduce el problema de contaminación con otros organismos. Por otro lado, su naturaleza filamentososa facilita considerablemente la separación de las células del medio de cultivo.

Nuestro grupo ha prestado especial atención al potencial de las cianobacterias fijadoras de nitrógeno para la producción de ficobiliproteínas. Se han seleccionado estirpes con valores particularmente altos de ficocianina, aloficocianina o ficoeritrina. Entre ellas se encuentran *Anabaenopsis* sp. y *Nostoc paludosum*, aisladas de la Albufera de Valencia, y *Anabaena variabilis*, especialmente ricas en C-ficocianina (13-18% del peso seco); las dos últimas estirpes y *Anabaena* sp. ATCC 33047 presentan también niveles particularmente altos en aloficocianina (10-11% del peso seco); mientras que tres estirpes de *Nostoc*, aisladas de la Albufera de Valencia y lagunas de Doñana y Chile, destacan por su alto contenido en C-ficoeritrina (8-10% del peso seco). *Anabaena* sp. ATCC 33047 y *Nostoc* sp. (Albufera) muestran, asimismo, amplios márgenes de tolerancia a la temperatura, pH y salinidad (Rodríguez *et al.*, 1989; Moreno *et al.*, 1995).

En dos estirpes de *Nostoc* ricas en ficoeritrina se han optimizado las condiciones que promueven el incremento celular de los niveles de ficobiliproteínas. El contenido en estos pigmentos se incrementa marcadamente al aumentar la temperatura, dentro de los márgenes óptimos para el crecimiento, y la densidad celular, así como al disminuir la irradiancia. En todos los casos el efecto es más marcado para la C-ficoeritrina, cuyo contenido aumenta del 50 al 100%, que para la C-ficocianina y aloficocianina. La capacidad de algunas cianobacterias que contienen ficoeritrina para adaptarse cromáticamente puede también utilizarse para incrementar específicamente su contenido, bien en ficoeritrina o en ficocianina. El nivel de ficoeritrina de las estirpes de *Nostoc* ricas en este pigmento se incrementa alrededor del 60% por iluminación con luz verde, específicamente absorbida por dicha ficobiliproteína, mientras que la ficocianina y aloficocianina aumentan

sólo ligeramente. Por el contrario, la luz roja, absorbida por la C-ficocianina, promueve un incremento de alrededor del 60% en el contenido en dicho pigmento, disminuyendo considerablemente el nivel de ficoeritrina (Rodríguez *et al.*, 1991).

En cultivos al exterior de las estirpes *Nostoc* sp. (Albufera) y (Doñana), ricas en ficoeritrina, y *Anabaena* sp. ATCC 33047, rica en aloficocianina, se ha estudiado el efecto de distintos factores ambientales y nutricionales sobre la productividad, en estanques abiertos de 1 m² de superficie agitados por paletas. Bajo condiciones óptimas de crecimiento se han obtenido valores de productividad de más de 20 g (peso seco) m⁻² día⁻¹ en verano, con una media anual de alrededor de 15 g (peso seco) m⁻² día⁻¹. Las productividades de ficobiliproteínas (ficoeritrina, aloficocianina o ficocianina) alcanzadas son mayores de 1 g m⁻² día⁻¹ (Moreno *et al.*, 1995). Los cultivos al aire libre de estas cianobacterias representan, por tanto, una forma eficiente de producir estos pigmentos de interés comercial, constituyendo una alternativa válida a los sistemas actualmente utilizados.

BIBLIOGRAFÍA

- Arad, S., Cohen, E. y Ben Amotz, A. (1993). Accumulation of canthaxanthin in *Chlorella emersonii*. *Physiol. Plant.* 87: 232-236.
- Becker, E.W. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology* (Baddiley, J., Carey, N.H., Hoggins, I.J. y Potter, W.G., eds.). Cambridge Studies in Biotechnology. Cambridge University Press. Cambridge.
- Ben-Amotz, A. y Avron, M. (1989). The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. En: *Algal and Cyanobacterial Biotechnology* (Cresswell, R.C., Rees, T.A.V. y Shah, N., eds.), pp. 90-114. Longman Scientific and Technical Press. Nueva York.
- Ben-Amotz, A. y Avron, M. (1990). The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trends Biotechnol.* 8: 121-126.

- Ben-Amotz, A. y Shaish, A. (1992). β -carotene biosynthesis. En: *Dunaliella*: Physiology, Biochemistry and Biotechnology (Avron, M. y Ben-Amotz, A., eds.), pp. 205-216. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Didigare, R.R., Ondrusek, M.E., Kennicutt II, M.C., Iturriaga, R., Harvey, H.R., Hohan, R.W. y Macko, S.A. (1993). Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. *J. Phycol.* 29: 427-434.
- Borowitzka, L.J., (1992). Commercial *Dunaliella* production: history of development. En: Profiles on Biotechnology (Villa, T.G. y Abalde, J., eds.), pp. 233-245. Servicio de Publicaciones, Universidad de Santiago, Santiago de Compostela, España.
- Borowitzka, M.A. (1988). Vitamins and fine chemicals from microalgae. En: Micro-algal Biotechnology (Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J., eds.), pp.153-196, Cambridge University Press, Cambridge.
- Borowitzka, M.A. (1992). Comparing carotenogenesis in *Dunaliella* and *Haematococcus*: implications for commercial production strategies. En: Profiles on Biotechnology (Villa, T.G. y Abalde, J., eds.), pp. 301-310. Servicio de Publicaciones, Universidad de Santiago, Santiago de Compostela, España.
- Boussiba, S. y Vonshak, A. (1991). Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol.* 32: 1077-1082.
- Breitenbach, J., Misawa, N., Kajiwara, S. y Sandmann, G. (1996). Expression in *Escherichia coli* and properties of the carotene ketolase from *Haematococcus pluvialis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 140: 241-246.
- Callegari, J.P. (1989). Feu vert pour les microalgues. *Biofutur* 76: 25-40.
- Chaumont, D. y Thepenier, C. (1995). Carotenoid content in growing cells of *Haematococcus pluvialis* during a sun-light cycle. *J. Appl. Phycol.* 7: 529-537.
- Cohen, Z. (1986). Products from Microalgae. En: Handbook of Microalgal Mass Culture (Richmond, A., ed.), pp. 421-454, CRC Press, Boca Raton, Florida.

- Dainippon Ink y Chemicals Inc. (1980). Production of highly purified alcoholophilic phycocyanin. Japanese patent 8077, 890.
- Dainippon Ink y Chemicals Inc. (1981). Cosmetics containing water soluble phycocyanin. Japanese patent, 79-138755.
- Dainippon Ink y Chemicals y Tokyo Kenkyukai (inventors and assignee) (1983) "Antitumoral agents containing phycobilin -also used to treat ulcers and hemorrhoidal bleeding". JP 58065216 A 830418.
- Edge, R., McGarvey, D.J. y Truscott T.G. (1997). The carotenoids as antioxidants -a review. J. Photochem. Photobiol. B: Biology 41: 189-200.
- Eskling, M., Arvidson, P. y Akerlund, H. (1997). The xanthophyll cycle, its regulation and components. Physiol. Plant. 100: 806-816.
- Farrow, W.M. y Tabenkin, B. (1966). Process for the preparation of lutein, U.S. Patent 3, 280, 502.
- Gilmore, A.M. (1997). Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. Physiol. Plant. 99: 197-209.
- Glazer, A.N. (1987). Phycobilisomes: assembly and attachment. En: The Cyanobacteria (Fay, P. y Van Baalen, C., eds.), pp 69-94, Elsevier Science Pub., Amsterdam.
- Glazer, A.N. y Stryer, L. (1984). Phycofluor probes. Trends Biochem. Sci. 9: 423-427.
- Goodwin, T.W. (1992). Distribution of Carotenoids. En: Methods in Enzymology, vol 213, (Packer, L., ed.), pp. 167-172. Academic Press, Inc., San Diego.
- Hagen, C., Braune, W., Vogel, K. y Häder, P.P. (1993). Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Giröd) Rostafinski (Volvocales). V. Influences on photomovement. Plant Cell Environ. 16: 991-995.
- Harvey, W. (1988). Cracking open marine algae biological treasure chest. Biotechnol. 6: 488-492.

- Henrikson, R. (1989). New medical research with *Spirulina*. En: Earth Food *Spirulina*, Ronore Enterprises Inc., pp. 61-73, Laguna Beach, California.
- Johnson, E.A., y Schroeder, W.A. (1995). Microbial carotenoids. En: Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, vol 53, (Fiechter, A., ed.), pp. 119-178. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Kajiwara, S., Kakizono, T., Saito, T., Kondo, K., Ohtani, T., Nishio, N., Nagai, S. y Misawa, N. (1995). Isolation and functional identification of a novel cDNA for astaxanthin biosynthesis from *Haematococcus pluvialis*, and astaxanthin synthesis in *Escherichia coli*. Plant Mol. Biol. 29: 343-352.
- Kobayashi, M., Kakizono, T. y Nagai, S. (1993). Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 867-873.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S., Kurimura, Y. y Tsuji, Y. (1997). Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 351-356.
- Kronick, M.N. (1986). The use of phycobiliproteins as fluorescent labels in immunoassay. J. Immunol. Methods 92: 1-13.
- MacColl, R. y Guard-Friar, D. (1987). Phycobiliproteins. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Moreno, J., Rodríguez, H., Vargas, M.A., Rivas, J. y Guerrero, M.G. (1995). Nitrogen-fixing cyanobacteria as source of phycobiliprotein pigments. Composition and growth performance of ten filamentous heterocystous strains. J. Appl. Phycol. 7: 17-23.
- Mörschel, E., Koller, K.P. y Wehrmeyer, W. (1980). Biliprotein assembly in the disc-shaped phycobilisomes of *Rhodella violacea* electron microscopical and biochemical analyses of C-phycocyanin and allophycocyanin aggregates. Arch. Microbiol. 125: 43-51.

- Nelis, H.J. y DeLeenher, A.P. (1989). Microbial production of carotenoids other than β -carotene. En: *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors* (Vandamme, E.J., ed.), pp. 43-80. Elsevier Applied Science, Londres.
- Nelis, H.J. y DeLeenher, A.P. (1991). Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 181-191.
- Perdomo J. (1986). Phycobiliproteins as fluorescence tracers. *Biomedical News* 1: 1-12. Biomedica Corporation, P.O. Box 8045, Foster City, CA 944404, USA.
- Pfander, H. (1992). Carotenoids: An overview. En: *Methods in Enzymology*, vol 213, (Packer, L., ed.), pp. 167-172. Academic Press, Inc., San Diego.
- Plumley, F.G. y Schmidt, G.W. (1987). Reconstitution of chlorophyll a/b light-harvesting complexes: Xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 146-150.
- Richmond, A. (1986). Microalgae of economic potential. En: *Handbook of Microalgal Mass Culture* (Richmond, A., ed.), pp. 199-243. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Richmond, A. (1990). Large scale microalgal culture and applications. En: *Progress in Phycological Research*, vol 7, (Round, M. y Chapman S., eds.), pp. 270-330. Biopress Ltd., Bristol.
- Rise, M., Cohen, E., Vishkantsan, M., Cojocaru, M., Gottlieb, H. y Arad, S. (1994). Accumulation of secondary carotenoids in *Chlorella zofingiensis*. *J. Plant Physiol.* 144: 287-292.
- Rodríguez, H., Rivas, J., Guerrero, M.G. y Losada, M. (1989). Nitrogen-fixing cyanobacterium with a high phycoerythrin content. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 758-760.
- Rodríguez, H., Rivas, J., Guerrero, M.G. y Losada, M. (1991). Enhancement of phycobiliprotein production in nitrogen-fixing cyanobacteria. *J. Biotechnol.* 20: 263-270.

- Rowan, J.S. (1989). *Photosynthetic Pigments of Algae*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sieferman-Harms, D. (1987). The light harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol. Plant.* 69: 561-568.
- Spurgeon, S.L. y Porter, J.W. (1980). Carotenoids. En: *The Biochemistry of Plants*, vol 4, (Stumpf, P.K. y Conn, E., eds.), pp. 419-482. Academic Press, Londres.
- Stevens, Jr. S.E. y Nierzwicki-Bauer, S.A. (1991). The cyanobacteria. En: *Structure of Phototrophic Prokaryotes*. (Stolz, J.F., ed.), pp. 15-47. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Taylor, C.B. (1996). Control of cyclic carotenoid biosynthesis: no lutein, no problem!. *Plant Cell* 8: 1447-1450.
- Theriault, R.J. (1965). Heterotrophic growth and production of xanthophylls by *Chlorella pyrenidosa*. *Appl. Microbiol.* 13: 402-416.
- Tjahjono, A.E., Hajama, Y., Kakizono, T., Terede, Y., Nishio, N. y Nagai, S. (1994). Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotech. Lett.* 16: 133-138.
- VERIS. Vitamin E Research And Information Service (1997). Efficacy of carotenoids. *Veris Research Summary*, August, Vitamin E Research and Information Service, La Grange, Illinois.
- Vonshak, A. (1988). Porphyridium. En: *Microalgal Biotechnology* (Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J., eds.), pp. 122-134. Cambridge University Press, Cambridge.
- Yong, Y.Y.R. y Lee, Y.K. (1991). Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta)?. *Phycologia* 30: 257-261.
- Zamir, A. (1992). Molecular biology of *Dunaliella*. En: *Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology* (Avron, M. y Ben-Amotz, A., eds.), pp. 195-203. CRC Press, Boca Raton, Florida.