

## LA MICROALGA *Haematococcus* COMO FUENTE DE ASTAXANTINA

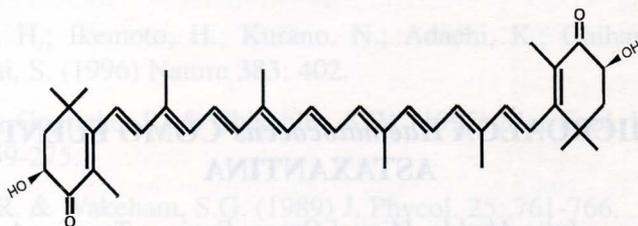
*Julio Abalde, Miguel Orosa, Enrique Torres y Angeles Cid*

Laboratorio de Microbiología. Departamento de Biología Celular e  
Molecular. Facultad de Ciencias. Universidade da Coruña

Los carotenoides constituyen la mayor clase de pigmentos naturales. Más de 600 de ellos han sido identificados en plantas, animales, bacterias y hongos. En las células fotosintéticas los carotenoides sirven como pigmentos accesorios en la captación de la luz y como protección contra los daños de la fotooxidación. El cetocarotenoide astaxantina (3,3'-dihidroxy- $\beta$ ,  $\beta$ - caroteno-4,4'-diona) (Fig. 1) es el pigmento carotenoide mas abundante encontrado en los animales marinos; es producido por varios tipos de microorganismos, incluyendo el alga verde *Haematococcus pluvialis* y la levadura *Phaffia rhodozyma*. Es el responsable de la coloración roja de los crustáceos, moluscos y de los salmónidos, así como de algunas aves, como los flamencos. A pesar de su alto nivel endógeno, estos animales no poseen la posibilidad de sintetizar astaxantina u otros pigmentos carotenoides *de novo*. Otras funciones biológicas de la astaxantina incluyen efecto preventivo del cáncer, incremento de la respuesta inmune e inhibición de los radicales libres. Es, por tanto, la astaxantina un producto con potencial utilización en la industria alimenticia y farmacéutica. La astaxantina pertenece a la clase de las xantofilas, carotenoides que están modificados por grupos funcionales oxigenados.

Los carotenoides son sintetizados *de novo* por todos los organismos fotosintéticos y, en ocasiones, por algunos otros microorganismos como

hongos y bacterias no fotosintéticas. Algunos animales vertebrados e invertebrados tienen la capacidad de metabolizar y modificar químicamente la estructura de algunos carotenoides que ingieren en la dieta.



**Astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta$ - $\beta$ -caroteno-4,4'-diona)**

Figura 1.- Estructura química de la astaxantina

En las plantas superiores encontramos carotenoides en muy diferentes órganos, como en las hojas  $\beta$ -caroteno, luteína, etc.), frutos (licopeno en el tomate), rizomas y raíces  $\beta$ -caroteno en zanahoria), semillas  $\beta$ -caroteno en trigo), etc (Goodwin y Britton, 1988).

La concentración media de carotenoides en las algas oscila entre el 0.1-2% de su peso seco; sin embargo, algunas especies acumulan cantidades mucho más altas bajo ciertas condiciones. Un ejemplo de esto es *Dunaliella salina*, que acumula hasta un 14% de  $\beta$ -caroteno bajo ciertas condiciones de estrés nutricional, alta salinidad y alta luminosidad (Borowitzka *et al.*, 1984)

Los carotenoides primarios están asociados con las clorofilas en los tilacoides, donde pueden absorber y transmitir a los fotosistemas la energía procedente de determinadas radiaciones luminosas, además de tener funciones fotoprotectoras, estabilizando a las moléculas de clorofila frente al oxígeno o radiaciones extremas; es debido a esta función como lípido antioxidante por la que se han propuesto como agente anticancerígeno (Burton y Ingold, 1984). Los carotenoides secundarios, como es la astaxantina, pueden aparecer en el estigma de las algas, donde realizan funciones de fotorreceptores para la fototaxis. En las membranas cloroplastídicas y tilacoidales algunos carotenoides sufren reacciones de epoxidación y des-epoxidación inducidas por la luz (Jeffrey, 1980).

Los carotenoides secundarios se localizan en el citoplasma, como en el caso de *Haematococcus pluvialis*, en la cual la astaxantina se acumula en la región perinuclear del citoplasma de las aplanosporas (Santos y Mesquita, 1984). La astaxantina se acumula bajo condiciones de limitación de nutrientes, como el  $\beta$ -caroteno cloroplastídico de *Dunaliella*. Sin embargo, las vías de síntesis en *Haematococcus* y *Dunaliella* deben ser bastante diferentes ya que el exceso de  $\beta$ -caroteno de *Dunaliella salina* y *D. parva* forma vesículas en el cloroplasto (Ben-Amotz *et al.*, 1982; Borowitzka *et al.*, 1984), mientras que la astaxantina de *Haematococcus* forma vesículas en los alrededores del núcleo (Lang, 1968). Es posible que el aparato de Golgi esté implicado en la formación de astaxantina (Borowitzka, 1988). Además, la síntesis de astaxantina por *Haematococcus* se realiza en situación de cese de la división celular, cese de la fotosíntesis y en situaciones en que se produce un cambio morfológico profundo en la célula, situaciones que no se producen en el caso de la acumulación de  $\beta$ -caroteno por *Dunaliella*.

Al igual que en el caso de las bacterias no fotosintéticas, no todos los hongos sintetizan carotenoides, y entre los que los producen hay una gran diversidad; así, algunos sintetizan sólo carotenos (generalmente  $\beta$ -caroteno), y otros tienen como principales pigmentos las xantofilas. Es destacable la producción de astaxantina en la levadura *Phaffia rhodozyma*, en la que este carotenoide parece protegerla frente al estrés oxidativo, y su síntesis es estimulada por radicales oxígeno ( $H_2O_2$ ,  $O_2$ ). Los carotenoides parecen estar asociados con glóbulos lipídicos en la levadura, y podrían estar concentrados cerca de la envoltura celular (Johnson, 1992).

## FUNCIONES DE LOS CAROTENOIDES

En los organismos fotosintéticos los carotenoides parecen tener dos funciones muy definidas: en la propia fotosíntesis y en la protección de las estructuras fotosintéticas frente a la fotooxidación. En los tejidos no fotosintéticos de las plantas superiores, en hongos, así como en bacterias no fotosintéticas, también realizan funciones fotoprotectoras, pero el

mecanismo parece ser diferente que en los tejidos fotosintéticos (Goodwin, 1980).

La pared de esporas, polen y la pared celular de algunas algas contienen las llamadas esporopoleninas, que son macromoléculas extraordinariamente resistentes frente a agentes químicos y a la degradación biológica, que se consideran formadas por polímeros de carotenoides (Rau, 1988).

Está reconocido que la adaptación a las diferentes condiciones ambientales es un requisito obvio para la supervivencia de los organismos; para las plantas uno de los factores más importantes es la luz, que además de su función como fuente de energía para la fotosíntesis, es un importante factor de regulación en el desarrollo y movimiento, no sólo de ellas sino también de organismos no fotosintéticos. Los pigmentos sensoriales son necesarios para el reconocimiento de la luz ambiental, considerándose los carotenoides como posibles fotorreceptores en el fototropismo y la fototaxis (Rau, 1988).

En los animales, los carotenoides, además de sus función antioxidante, con posibles propiedades terapéuticas del  $\beta$ -caroteno como agente anticancerígeno (Peto *et al.*, 1981), también parecen ejercer influencia sobre el crecimiento y la reproducción (Nagasawa *et al.*, 1989). Así, los animales jóvenes acumulan pigmento en el músculo y una vez alcanzada la madurez sexual dicho pigmento es movilizado a los órganos reproductores, donde parece desempeñar un papel estimulador de la fertilidad y de la reproducción (Schiedt *et al.*, 1985). Por otro lado, el  $\beta$ -caroteno es el precursor del retinal, el cromóforo de todos los pigmentos visuales conocidos.

Aunque los animales no pueden sintetizar carotenoides *de novo*, algunas aves, peces e invertebrados pueden introducir modificaciones en los carotenoides que ingieren en la dieta. Las modificaciones más frecuentes resultan de la introducción de una función oxígeno en el anillo para producir astaxantina; no obstante, en peces como el salmón estas transformaciones no suceden y, por tanto, la carne rosa del salmón sólo se puede obtener cuando la propia astaxantina o la cantaxantina forman parte

de la dieta (Schiedt *et al.*, 1985). Las principales aplicaciones industriales de los carotenoides son dos: como colorantes alimentarios y como aditivos en alimentos para pigmentación animal.

En acuicultura, los cetocarotenoides astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta$ - $\beta$ -caroteno-4,4'-diona) y cantaxantina ( $\beta$ - $\beta$ -caroteno-4,4'-diona) se utilizan ampliamente suplementando la dieta de salmónidos, como método para inducir una coloración deseable, ya que son los principales pigmentos en la carne de los salmónidos salvajes. Además, los carotenoides precursores de la astaxantina y la propia astaxantina contribuyen al sabor característico del salmón (An *et al.*, 1989), así como también se ha demostrado que incrementan la supervivencia de los huevos y el porcentaje de huevos fertilizados, protegiéndolos contra condiciones extremas (Craik, 1985) y estimulando el crecimiento (Torrissen, 1984).

Aunque el pigmento cantaxantina puede ser también beneficioso, la astaxantina es preferible porque produce una pigmentación idéntica a la de la carne de los salmónidos salvajes, se deposita más eficientemente (Torrissen, 1986) y es más estable durante el proceso de pigmentación del pez (Skrede y Storebakken, 1987).

La cianobacteria *Spirulina*, así como la levadura *Phaffia rhodozyma* producen una aceptable coloración cuando se utilizan para alimentar a los salmónidos, aunque no se utilizan ampliamente todavía en acuicultura comercial. Actualmente ha adquirido gran interés como fuente de astaxantina el alga verde *Haematococcus pluvialis* (Flotow), que ha demostrado ser una fuente efectiva de pigmentación para los salmónidos (Sommer *et al.*, 1991).

## **CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE *Haematococcus***

El alga verde dulceacuícola *Haematococcus pluvialis* Flotow (Volvocales, Chlorophyceae), tiene una forma elipsoide hasta redondeada al final de la parte anterior y posterior, biflagelada y móvil en su estado vegetativo. La cubierta celulósico-péctica no está adherida al protoplasma, pero está unido a él por tractos (Feldmann, 1989). Durante

periodos de estrés, las células se reúnen, pierden sus flagelos, y forman una gruesa y persistente pared cística, que posiblemente contenga esporopolenina (Burczyk, 1987). Al mismo tiempo, las células empiezan a acumular masivamente astaxantina, notándose primeramente la deposición alrededor del núcleo y continuando radialmente hasta que todo el protoplasto es de color rojo. Los dos procesos, enquistamiento y acumulación de astaxantina, están generalmente acoplados, pero son, de hecho, procesos distintos y pueden ser experimentalmente separados en el tiempo (Bubrick, 1991). Las aplanosporas contienen 1-2% de su peso seco como astaxantina (Borowitzka, 1992), predominantemente en la forma de monoésteres de ácidos grasos en el estadio estacionario temprano, el cual no posee una pared celular gruesa (Renstrom y Liaaen-Jensen, 1981). En estados posteriores, cuando ya posee una pared celular gruesa, dominan los diésteres, lo que apunta hacia una esterificación en los estados finales del desarrollo (Grung *et al.*, 1992); los cistes maduros podrían contener más de un 3% de su peso seco como astaxantina esterificada, describiéndose valores máximos de un 5% (Czygan, 1968; Renstrom y Liaaen-Jensen, 1981). La esterificación de la astaxantina con ácidos grasos representa un posible mecanismo por el cual este cromóforo puede ser concentrado en glóbulos citoplasmáticos para maximizar su eficiencia fotoprotectora (Bidigare *et al.*, 1993).

En el ciclo vital de *Haematococcus pluvialis* se pueden distinguir los siguientes estados (Fig. 2): la típica célula de resistencia o hematociste, rodeada por una gruesa membrana celulósica, la forma flagelada alargada o macrozooide, las pequeñas formas flageladas esbeltas o microzoooides y el estado de aplanospora no móvil, encerrada en una fina membrana de celulosa.

El hematociste es la forma de resistencia, con una gruesa pared separada por un apreciable espacio del protoplasma. Cuando los hematocistes de cultivos con nutrientes agotados se traspasan a otro medio con nutrientes adecuados, la gruesa pared cística pronto desaparece y como resultado de la fisión aparecen células hijas flageladas, las cuales nadan dentro de la vieja pared celular. Esos macrozoooides contienen mucha astaxantina, aunque aparece en la periferia de la célula una fina

línea de clorofila, la cual, tras las subsiguientes divisiones, aumenta en grosor.

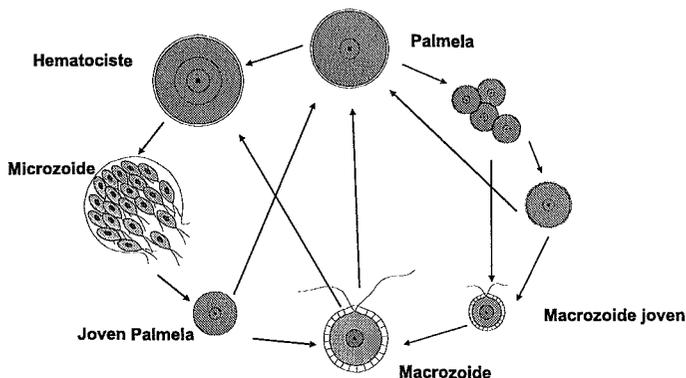


Figura 2.- Ciclo vital de *Haematococcus pluvialis* (Elliot, 1934)

Las aplanosporas, formas esféricas no móviles, siguen a los macrozooides en la secuencia normal de células en el cultivo y salvo por la ausencia de flagelos la estructura de los protoplastos varía muy poco con respecto a la de los macrozooides. Tienen una membrana lisa, dura, y división activa en el interior, de modo que después de algún tiempo brotan hasta 60 células hijas, las cuales pueden permanecer mucho tiempo en la membrana materna (falsamente designada palmela). De las aplanosporas a su vez, con o sin división, brotan individuos normales móviles o los pequeños microzooides, pero a estos “enjambres” no se los ha observado todavía en su función sexual (Huber-Pestalozzi, 1961).

Bajo condiciones de crecimiento desfavorables, o debido a diferentes tipos de estrés ambiental, las células de *Haematococcus* forman cistes y acumulan grandes cantidades de astaxantina en su citoplasma, dando lugar a una coloración rojiza de la célula (Borowitzka *et al.*, 1991). Estas células rojas de resistencia son fotosintéticamente competentes, pero operan a una actividad fotosintética muy reducida; esta disminución de la actividad es principalmente atribuible a la falta de citocromo *f* y, por tanto, la esperada ausencia de un flujo lineal de electrones desde el PS II al PS I, y en menor medida un descenso en algunos componentes de los PS II y

PS I. La pérdida y disminución preferencial de proteínas fotosintéticamente esenciales en las aplanosporas podría atribuirse a una disminución en los procesos de nueva síntesis y reparación debido al estrés impuesto por unas condiciones ambientales desfavorables (Tan *et al.*, 1995).

## BIOSÍNTESIS DE LOS CAROTENOIDES

La biosíntesis de carotenoides (Fig. 3) comienza a partir del precursor isoprénico C<sub>5</sub> isopentenilpirofosfato (IPP), aunque el primer precursor específico es el compuesto C<sub>6</sub> ácido mevalónico (MVA), el cual por un proceso de descarboxilación produce IPP.

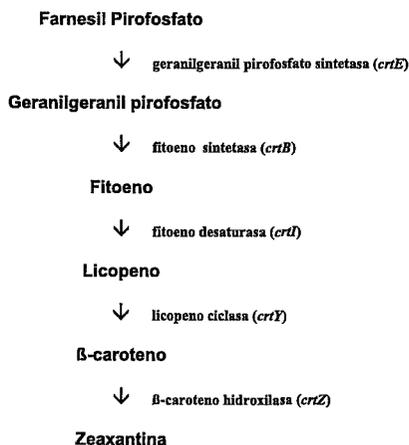


Figura 3.- Ruta de biosíntesis de los carotenoides primarios con indicación de los enzimas implicados y los genes que los codifican.

El proceso de elongación de la cadena comienza con la isomerización del IPP a dimetilalilpirofosfato (DMAPP), la transferencia secuencial de 3 moléculas de IPP al DMAPP da como resultado geranilpirofosfato (GPP), farnesilpirofosfato (FPP) y geranilgeranil pirofosfato (GGPP), respectivamente. El primer paso de la biosíntesis de tetraterpenos C<sub>40</sub>, implica la unión covalente “cabeza con cabeza” de dos

moléculas de GGPP, dando lugar tras una serie de reacciones a fitoeno, el cual sufre un proceso de deshidrogenación que conduce a la síntesis de licopeno. A partir de aquí, el licopeno puede sufrir un gran número de reacciones metabólicas que implican el doble enlace C-1,2 y darán lugar a una gran diversidad de carotenoides. Estas reacciones incluyen la ciclación, hidroxilación, hidrogenación, adición de más C<sub>5</sub> isoprenoides con o sin ciclación, etc., dando como uno de los productos finales β-caroteno.

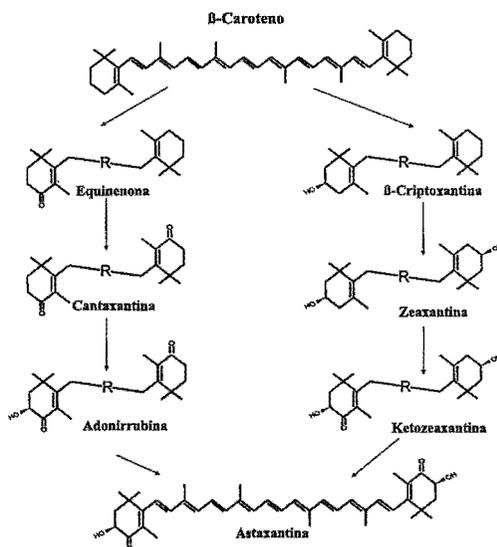


Figura 4.- Posibles rutas de síntesis, con los productos intermedios, para la obtención de astaxantina a partir de β-caroteno.

La síntesis de astaxantina (Fig. 4) se produce a partir de β-caroteno. Aunque las xantofilas se encuentran universalmente en los cloroplastos de las plantas, la biosíntesis de astaxantina está limitada casi de manera exclusiva a los microorganismos, como la levadura *Phaffia rhodozyma*, la microalga *Haematococcus pluvialis* y bacterias marinas como *Agrobacterium* y *Alcaligenes*. Las rutas de síntesis propuestas son diferentes en los distintos microorganismos; mientras en *Phaffia rhodozyma* el grupo carbonilo se introduce en primer lugar al β-caroteno

dando lugar a equinenona, la cual es convertida a 3-hidroxi equinenona y adonirrubina (Andrewes *et al.*, 1976), en las microalgas se ha propuesto que los grupos hidroxilo C-3 se introduzcan en primer lugar, para dar el estereoisómero normal (3R,3'R)-zeaxantina, en el cual se introducen los grupos cetónicos C-4 (Britton, 1988). Sin embargo, utilizando difenilamina, inhibidor de la síntesis de astaxantina, se ha propuesto una nueva vía de síntesis (Fan *et al.*, 1995), en la cual los grupos cetónicos C-4 son introducidos al  $\beta$ -caroteno en primer lugar (Fig. 4).

### **FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA POR *Haematococcus*.**

Las formas verdes de las células de *Haematococcus* se caracterizan por presentar una composición pigmentaria constituida fundamentalmente por luteína, clorofilas *a* y *b* y  $\beta$ -caroteno; sin embargo, el perfil pigmentario determinado por HPLC en las formas rojas se caracteriza por la aparición de cantaxantina, astaxantina y una serie de combinaciones diferentes de astaxantina esterificada con distintos ácidos grasos dando lugar a la formación de mono y diésteres (Fig. 5).

Este cambio entre las fases verdes y rojas de las células de *Haematococcus* se debe a condiciones ambientales que provocan situaciones de estrés que inducen el comienzo de la síntesis de la astaxantina. Estas condiciones que favorecen la acumulación de astaxantina en *Haematococcus* son variadas. Así, por ejemplo, a una intensidad de luz óptima para el crecimiento ( $85 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) el contenido de astaxantina en células en crecimiento logarítmico permanece casi constante, mientras que en cultivos expuestos a altas intensidades de luz ( $170 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) la astaxantina se acumula masivamente (Boussiba *et al.*, 1992); intensidades luminosas superiores a  $90 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  limitan la tasa de crecimiento, así como las altas temperaturas, estando la división celular totalmente inhibida a  $33 \text{ }^\circ\text{C}$  (Fan *et al.*, 1994). Bajo la misma intensidad luminosa, la iluminación continua es más efectiva para la formación de carotenoides que un ritmo nictimeral 12:12 h, resultando, por tanto, que la cantidad de luz, definida como el producto de la

intensidad luminosa por el tiempo neto de iluminación, es un parámetro más importante en la biosíntesis de carotenoides que la intensidad de esa luz; también parece que el contenido en carotenoides es mayor en cultivos sometidos a luz azul que a luz roja, llegando incluso las formas vegetativas “nadadoras” de *Haematococcus* a mostrar una fototaxis preferencial hacia la luz azul (Kobayashi *et al.*, 1992).

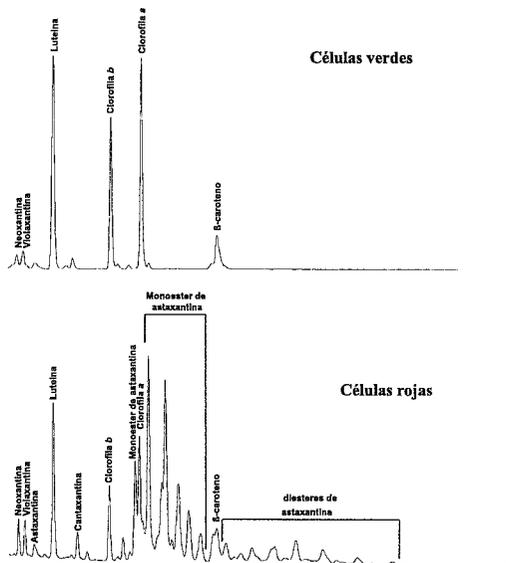


Figura 5.- Cromatogramas obtenidos por HPLC de los pigmentos extraídos de células de *Haematococcus pluvialis* en forma de células vegetativas de color verde y en estado de células cargadas de astaxantina.

Otros estudios sugieren que el principal factor inductor de la síntesis de astaxantina en *Haematococcus* podría ser el estrés oxidativo generado por la reacción fotosintética más que la luz por sí misma, y se ha demostrado que la adición al medio de cultivo de generadores de radicales libres y especies de oxígeno activas potencian la formación de astaxantina, mientras que la adición de captadores de radicales oxígeno suprime la síntesis de astaxantina, realizándose estos experimentos en células que no se estaban dividiendo (Kobayashi *et al.*, 1993).

Las concentraciones de nitrato y fosfato pueden variar en un amplio rango sin afectar significativamente a la tasa de crecimiento o producción celular; sin embargo, bajas concentraciones de nitrógeno o altas concentraciones de fosfato estimulan la formación de aplanosporas rojas en *Haematococcus* (Borowitzka *et al.*, 1991). El cultivo en un medio sin sulfato, concentraciones de NaCl superiores al 0.8% (w/v) o la utilización de inhibidores de la división celular como la vinblastina, incrementan la acumulación de astaxantina en las células de resistencia, ya que esta acumulación sería inducida por cualquier alteración que impida la división celular (Boussiba *et al.*, 1992). Por el contrario, otras observaciones parecen indicar que la síntesis de astaxantina podría estar regulada por la presión parcial de O<sub>2</sub> disuelto mientras la tasa de división de los cultivos se mantiene en valores constantes (Lee y Ding, 1995).

Generalmente, se vienen utilizando como potenciadores de la acumulación de astaxantina la limitación de nitrógeno y altas intensidades luminosas, lo que concuerda con la observación de que el fitoplancton parece ser más sensible al exceso de luz visible bajo condiciones de limitación de nutrientes (Prézelin *et al.*, 1986). Un mecanismo que puede explicar este fenómeno es que bajas reservas celulares de nitrógeno reducen la tasa de renovación de la proteína Q<sub>b</sub> (quinona aceptora de electrones del PS II) y esto incrementa la susceptibilidad celular a la fotoinhibición (Bidigare *et al.*, 1993).

Otros estudios Hegan a la conclusión de que la acumulación de astaxantina en *Haematococcus* es un proceso no necesariamente asociado con la transformación morfológica de células elipsoidales móviles a células esféricas no móviles, llegando a la conclusión de que la tasa de síntesis de astaxantina es similar tanto en células móviles como en células inmóviles (Lee y Ding, 1994), aunque en las primeras la cantidad de astaxantina por célula es mucho menor debido al efecto de dilución que sobre ella actúa en las rápidas divisiones celulares, que no ocurren, o lo hacen más lentamente en las células inmóviles.

Un aspecto aún no muy claro, es el de la transformación de células móviles a inmóviles. La tasa específica de división celular parece ser función de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, siendo

máxima y prácticamente constante a concentraciones de nitrato no limitantes. Sin embargo, independientemente de la tasa de crecimiento, las células móviles dejan de dividirse después de cinco duplicaciones celulares, sin que esté claro si ese número de divisiones celulares está genéticamente predeterminado o viene dado por parámetros del crecimiento, como la densidad de flujo de fotones. Cesada la división de las zoosporas, ocurre la fusión celular y en las siguientes 50 horas el contenido en ADN de la mayoría de las células se dobla y pronto las células elipsoidales se transforman en células esféricas no móviles (Lee y Ding, 1994). A pesar de los cambios morfológicos y pigmentarios que siguen a la célula después de perder su movilidad, la aplanospora continúa funcionando como una célula fotosintéticamente activa, aunque con una tasa menor que la de la célula verde; además, esa transformación conlleva una síntesis y acumulación de astaxantina, así como la formación de una gruesa pared celular, que debido a la reducción en la fotosíntesis deriva de la utilización de compuestos de reserva internos, notándose un incremento de la respiración en oscuridad indicativo de un proceso metabólico intenso (Zlotnik *et al.*, 1993). Se puede explicar el descenso en la tasa de fotosíntesis en la transición a aplanosporas de las células verdes, debida a una deficiencia en nitrógeno, por una moderada degradación de los enzimas asociados con las reacciones de la fase oscura de la fotosíntesis (Falkowski *et al.*, 1989).

La función de la astaxantina se suele asociar con fotoprotección de las células por absorción pasiva de fotones antes de que éstos alcancen los pigmentos fotosintéticos, reduciendo en gran medida la cantidad de luz transmitida a los complejos pigmento-proteína asociados con el fotosistema II, minimizando la potencial fotoinhibición y fotodestrucción originadas por luces azules de gran energía. Esto parece concordar con la localización del carotenoide, que se sitúa en el citoplasma, entre la fuente de luz y el aparato fotosintético (Bidigare *et al.*, 1993).

Otras observaciones que apoyan el posible papel fotoprotector de la astaxantina es la dispersión que sufre este carotenoide, normalmente situado en la zona central del citoplasma, bajo la influencia de una alta intensidad luminosa, extendiéndose hacia la periferia, llegando incluso a

parecer disperso por todo el citoplasma, dándole una tonalidad verde-rojiza y permaneciendo en esta disposición mientras persista la iluminación; cuando ésta desaparece, los carotenoides gradualmente regresan a la zona central de la célula (Yong y Lee, 1991).

Otras posibles funciones de la astaxantina, serían la de reserva energética, puesto que aparece esterificada por ácidos grasos, llegando a calcularse en algas rojas de zonas nevadas que la cantidad de ácidos grasos ligados a astaxantina podrían representar un 5 % del total de ácidos grasos celulares (Bidigare *et al.*, 1993).

La pared de los hematocistes se considera formada por esporopoleninas, macromoléculas extraordinariamente resistentes frente a agentes químicos y a la degradación biológica, formadas por polímeros entrecruzados de carotenoides y ésteres de carotenoides (Brooks *et al.*, 1971). La evidencia de esta asunción proviene principalmente de investigaciones con esporas fúngicas, a las cuales se incorporaba ácido mevalónico o  $\beta$ -caroteno marcado radiactivamente, determinándose que la radiactividad se incorporaba a la esporopolenina. Estudiando mutantes de *Chlorella fusca* deficientes en síntesis de pigmentos, se concluyó que existe una correlación entre la posibilidad de síntesis de cetocarotenoides y la de esporopolenina, existiendo un proceso biosintético de esporopolenina vía cetocarotenoides (como la astaxantina) (Burczyk, 1987). Esto coincide con la posición de la astaxantina en las diferentes fases del ciclo celular de *H. pluvialis*, en el cual la astaxantina aparece en los estadios iniciales en la zona central de la célula, desplazándose según se va acumulando hacia las zonas periféricas, donde por una polimerización oxidativa podrían dar lugar a la gruesa cubierta esporopolenínica de los hematocistes, con una función de protección mecánica.

La detección inmunológica de fitoeno desaturasas en células de *H. pluvialis* indica la presencia de dos proteínas fitoeno desaturasas en aplanosporas rojas, pero sólo una en las células verdes. Además, con difenilamina se bloquea completamente la síntesis normalmente masiva de  $\beta$ -caroteno en cultivos sin nitrato de *Dunaliella*, mientras que se acumulan grandes cantidades en *Haematococcus* (Vorst *et al.*, 1994).

Podría ser que los carotenoides primarios y secundarios sean codificados por genes divergentes, que codifican para diferentes proteínas que tienen la misma función; estos carotenoides son sintetizados por vías de síntesis paralelas pero divergentes, que incluyen los mismos precursores, pero con localizaciones celulares diferentes. Se debe recordar que el  $\beta$ -caroteno acumulado en *Dunaliella* es depositado en glóbulos cloroplastídicos, mientras que la astaxantina en *Haematococcus* se acumula en glóbulos lipídicos por toda la célula (Harker y Young, 1995).

La utilización de compuestos estimulantes de la ruta de biosíntesis de carotenoides como el acetato sódico, incrementa la producción de carotenoides totales por célula hasta un 360 % y el ácido malónico incrementa la producción en casi trece veces con respecto a los cultivos control autótrofos. Sin embargo, este incremento de la producción máxima se produce en concentraciones de un 2 % de estos compuestos orgánicos en el medio de cultivo, en los cuales el crecimiento es prácticamente nulo (Fig. 6) (Orosa *et al.*, 1998).

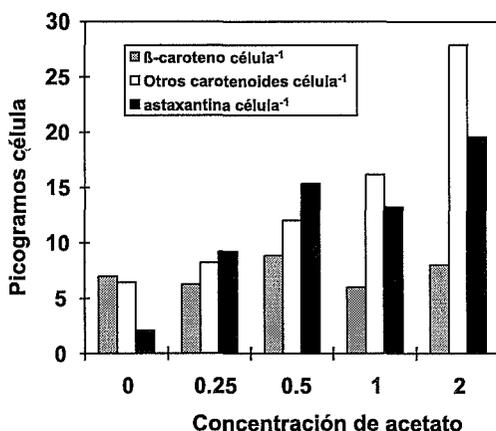


Figura 6.- Concentraciones celulares finales de distintos carotenoides (pg cel<sup>-1</sup>) determinados por HPLC en células de *Haematococcus pluvialis* en cultivos con distintas concentraciones de acetato.

A escala industrial, más que la concentración de carotenoides por célula, interesa la producción por litro de cultivo, obteniéndose los mejores resultados en los cultivos con un 0.5 % de acetato, con un incremento del 180 %, y en el caso del ácido malónico, en cultivos con un 0.25 % de este compuesto, con respecto a los controles sin acetato, un incremento del 267 %. A concentraciones mayores son menores las tasas de incremento de la producción (Orosa *et al.*, 1998).

Resultados semejantes se han obtenido en la levadura *Phaffia rhodozyma*, en la que el malonato incrementa la producción de carotenoides hasta un 240 %, añadiendo un 1 % de este ácido, y un 280 % de carotenoides totales con un 0.05 % de acetato; sin embargo, en estos cultivos la producción de astaxantina es un 19 % menor que la misma cepa crecida sin acetato (Calo, 1994), mientras que en *H. pluvialis* se produce con acetato un aumento en la acumulación de astaxantina por célula de casi 10 veces con respecto a los cultivos sin este compuesto.

## **OBTENCIÓN DE MUTANTES SUPERPRODUCTORES**

Se han realizado distintas experiencias para la obtención de mutantes superproductores de astaxantina en *Haematococcus*. Para la obtención de algunos de estos mutantes se ha utilizado la compactina, inhibidor de la 3-hidroxy-3-metilglucaryl-coenzima A reductasa (HMGR), responsable del paso de 3-hidroxy-3-metilglucaryl-coenzima A a mevalonato. La enzima HMGR parece ser uno de los enzimas reguladores clave en la biosíntesis de isoprenoides en un amplio rango de organismos. Los mutantes obtenidos resistentes a la compactina no sólo mostraron mayores niveles de astaxantina (hasta 2 veces más) que las cepas salvajes, sino que además tenían el enzima HMGR menos sensible a la compactina (Chumpolkulwong *et al.*, 1997).

Así mismo, se utilizaron distintos herbicidas que actúan inhibiendo específicamente la ruta de síntesis de los carotenoides para la obtención de mutantes resistentes de *Haematococcus pluvialis*; se generaron cepas híbridas por fusión de protoplastos entre los mutantes y estas presentan un incremento en los niveles de ploidía y una formación de carotenoides

hasta 3 veces superior de las cepas de tipo salvaje a las parentales (Tjahjono *et al.*, 1994).

## GENES IMPLICADOS EN LA CAROTENOGÉNESIS

El primer gen involucrado en la ruta de síntesis de carotenoides fue aislado en 1989 en la bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus*. Otros géneros utilizados inicialmente en los estudios de los genes implicados en la síntesis de carotenoides han sido *Erwinia*, *Erythrobacter* y *Synechococcus*. En lo referente a la microalga *Haematococcus* hasta el momento se han aislado los genes *bkt*, una cetolasa, y *crtO*, que intervienen en los procesos de transformación del  $\beta$ -caroteno en astaxantina dentro de la ruta de síntesis de los carotenoides secundarios.

En la última década se han realizado avances significativos respecto a los genes que codifican para los enzimas implicados en la biosíntesis de carotenoides. Se han clonado muchos genes de esta ruta de síntesis en distintos organismos, determinándose sus funciones. Los genes de la fitoeno sintasa, que cataliza la formación de fitoeno a partir del geranulgeranil-pirofosfato (GGPP) se aislaron de especies de la bacteria fotosintética *Rhodobacter* sp y de las bacterias no fotosintéticas *Erwinia* y *Thermus thermophilus*, de la cianobacteria *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942, del hongo *Neurospora crasa* y de plantas superiores. Muchos genes implicados en pasos de desaturación (deshidrogenación) para convertir el fitoeno en licopeno también se han obtenido de la bacteria fotosintética *Rhodobacter* sp, las bacterias no fotosintéticas *Erwinia* sp. y *Myxococcus xanthus*, la cianobacteria *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942, los hongos *Neurospora crasa* y *Cercospora nicotianae* y de plantas superiores. Un segundo gen de una desaturasa que realiza la desaturación a licopeno se ha obtenido de la cianobacteria *Anabaena* sp. cepa PCC 7120. Los genes que codifican para la licopeno ciclasa que cataliza la formación del  $\beta$ -caroteno se han aislado a partir de *Erwinia* sp. y *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942. La vía biosintética de carotenoides de *Erwinia* y las funciones de los genes de biosíntesis (Fig. 3) se han elucidado mediante análisis de los pigmentos acumulados en cepas de *E. coli* transformadas con distintas combinaciones de genes de *Erwinia* (Misawa *et al.*, 1995). Yokohama *et*

*al.* (1992) han demostrado que algunas bacterias marinas, incluyendo *Agrobacterium aurantiacum*, son capaces de sintetizar astaxantina. Se han aislado los genes de síntesis de astaxantina de *A. aurantiacum* usando como hospedador *E. coli* transformado con genes *crt* de *Erwinia* (Misawa *et al.*, 1995).

Los sustratos para dilucidar la síntesis de carotenoides fueron transformantes de *E. coli* con los genes de biosíntesis de carotenoides de *Erwinia uredovora* y *Agrobacterium aurantiacum*. Como resultado se propuso la ruta biosintética de la astaxantina a nivel de los genes de biosíntesis.

Los productos de los genes *crtW* y *crtZ* (Fig. 7), que median reacciones de oxigenación del  $\beta$ -caroteno a la astaxantina, tienen baja especificidad de sustrato. Esto permite la formación de muchos posibles intermediarios de la astaxantina, como la adonixantina, foenicoxantina (adonirrubina), cantaxantina, 3' hidroxiequinenona y 3 hidroxiequinenona (Misawa *et al.*, 1995).

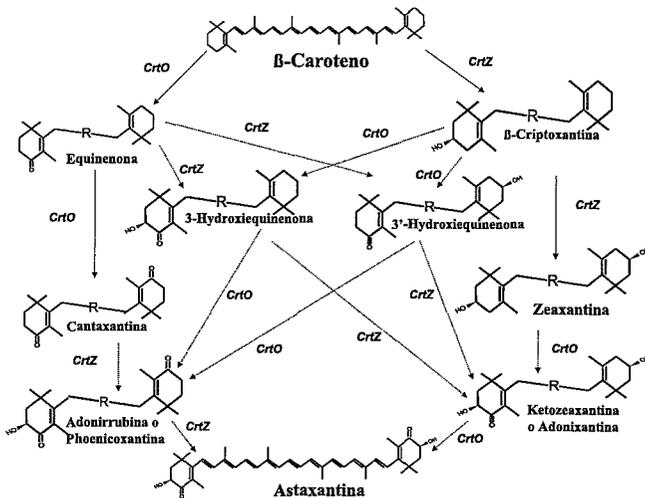


Figura 7.- Relación de las distintas rutas de síntesis de carotenoides secundarios que actúan como intermediarios, con indicación de los genes implicados en la biosíntesis y cada una de sus funciones. El gen *crtO* (Harper y Hirschberg, 1997) es homólogo de los genes *crtW* (Misawa *et al.* 1995) y *bkt* (Breitenbach *et al.*, 1996).

Un gen que codifica una  $\beta$ -caroteno cetolasa (*bkt*) se ha aislado en *Haematococcus pluvialis* y se ha expresado en *E. coli* previamente transformado con genes de la carotenogénesis de *Erwinia uredovora*. Genes de carotenoides cetolasas se han aislado y clonado, incluyendo el *crtW* de bacterias como *Agrobacterium aurantiacum* y el *bkt* de *Haematococcus* (Breitenbach *et al.*, 1996). Aunque los genes son homólogos, las enzimas codificadas presentan diferencias; mientras las proteínas CrtW de diferentes bacterias marinas presentan un 75% de identidad, esta es sólo del 37% cuando se comparan con la proteína BKT producto del gen *bkt* de *H. pluvialis*

El gen *crtO* que codifica una  $\beta$ -C-4-oxigenasa que convierte el  $\beta$ -caroteno en astaxantina fue clonado a partir del alga verde *Haematococcus pluvialis*. Este gen es homólogo al gen *crtW* aislado de distintas bacterias y citado anteriormente. Se transfirió en gen *crtO* a la cianobacteria *Synechococcus* PCC 7942 que contiene un gen para una  $\beta$ -caroteno hidroxilasa, y que normalmente acumula  $\beta$ -caroteno y zeaxantina. La cianobacteria genéticamente modificada produjo astaxantina así como otros cetocarotenoides. Estos resultados confirman que *crtO* puede funcionar en cianobacterias junto con sus enzimas de la carotenogénesis para producir astaxantina. Particularmente, este hallazgo indica que la  $\beta$ -caroteno hidroxilasa, que normalmente convierte en  $\beta$ -caroteno en zeaxantina, también puede funcionar en la biosíntesis de astaxantina (Harker y Hirschberg, 1997).

Un hecho sorprendente es que los enzimas CrtZ y CrtW son capaces de utilizar sustratos con grandes diferencias de polaridad, por ejemplo, anillo  $\beta$ -ionona y 4-ceto- $\beta$ -ionona como sustratos para CrtZ y anilo de  $\beta$ -ionona y 3-hidroxi- $\beta$ -ionona como sustratos para CrtW. Los enzimas parecen ser específicos para reacciones químicas pero no específicos para los sustratos. Debido a la versatilidad de los enzimas, se sintetizan seis cetocarotenoides diferentes a partir del  $\beta$ -caroteno con sólo dos genes, *crtW* y *crtZ*. Se ha sugerido (Cerdá-Olmedo, 1994) que los organismos carotenogénicos pueden tener un sorprendentemente pequeño número de genes de síntesis de carotenoides, aunque se han aislado más de 600 pigmentos carotenoides diferentes. Esta paradoja se explica, como se ha

dicho, porque la diversidad de compuestos orgánicos naturales distintos es compatible con una relativa escasez de genes de biosíntesis (Misawa *et al.*, 1995).

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Xunta de Galicia. (XUGA-10301B96).

## REFERENCIAS

- An, G.H., Schuman, D.B. y Johnson, E.A., (1989). *Appl. Environm. Microbiol.* 55: 116-124.
- Andrewes, A.G., Phaff, H.J. y Starr, M.P., (1976). *Phytochemistry.* 15: 1003-1007.
- Ben-Amotz, A., Katz, A. y Avron, M., (1982). *J. Phycol.* 18: 529-537.
- Bidigare, R.R., Ondrusek, M.E., Kennicutt, M.C., Iturriaga, R., Harvey, H.R., Hoham, R.W. y Macko, S.A., (1993). *J. Phycol.* 29: 427-434.
- Borowitzka, L.J., Borowitzka, M.A. y Moulton, T.P., (1984). *Hydrobiologia* 116-117: 115-34.
- Borowitzka, M.A., (1988). En: *Micro-algal Biotechnology*, Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. (Eds.). Cambridge, Cambridge Univ. Press. pp. 153-196.
- Borowitzka, M.A., (1992). *J. Appl. Phycol.* 4: 267-279.
- Borowitzka, M.A., Huisman, J.M. y Osborn, A., (1991). *J. Appl. Phycol.* 3: 295-304.
- Boussiba, S., Fan, L. y Vonshak, A., (1992). *Methods in enzymology.* 213: 386-391.
- Breitenbach, J., Misawa, N., Kajiwara, S. y Sandmann, G., (1996). *FEMS Microbiol. Letters.* 140: 241-246.

- Britton, G.,(1988). En: Plant Pigments, Goodwin, T.W. (Ed.). Padstow, Cornwall, Academic Press. pp: 133-177.
- Brooks, J., Grant, P.R., Muir, M., van Gijzel, P. y Shaw, G., (Eds.) (1971). London., Academic Press.
- Bubrick, P., (1991). *Biores. Technol.* 38: 237-239.
- Burczyk, J., (1987). *Phytochem.* 26: 121-128.
- Burton, G.W. y Ingold, K.U., (1984). *Science* 224: 569-73.
- Calo, M.P., (1994). Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 110 pp.
- Cerdá-Olmedo, E., (1994). *Crit. Rev. Microbiol*, 20: 151-160.
- Chumpolkulwong, N., Kakizono, T., Handa, T. y Nishio, N., (1997). *Biotechnology Letters* 19: 299-302.
- Craik, J.C.A., (1985). *Aquaculture* 41: 213-226.
- Czygan, F.C., (1968). *Arch. Mikrobiol.* 61: 81-102.
- Elliot, A.M. (1934). *Arch. Protistenk.* 82: 250-272.
- Falkowski, P.G., Sukenik, A. y Herzig, R., (1989). *J. Phycol.* 25: 471-478.
- Fan, L., Vonshak, A. y Boussiba, S., (1994). *J. Phycol.* 30: 829-833.
- Fan, L., Vonshak, A., Gabbay, R., Hirshberg, J., Cohen, Z. y Boussiba, S., (1995). *Plant Cell Physiol.* 36(8): 1519-1524.
- Feldmann, J.,(1989). En: Botánica vegetales inferiores. Editorial Reverté. Barcelona. pp: 97-324.
- Goodwin, T. y Britton, G.,(1988). En: Plant Pigments, Goodwin, T.W. (Ed.). Padstow, Cornwall, Academic Press. pp: 61-132.
- Goodwin, T.W., (1980). Chapman Hall, London.
- Grung, M., D'Souza, F.M.L., Borowitzka, M. y Liaaen-Jensen, S., (1992). *J. Appl. Phycol.* 4: 165-171.
- Harker, M. y Hirschberg, J., (1997). *FEBS Letters.* 404: 129-134.

- Harker, M. y Young, A.J., (1995). *Eur. J. Phycol.* 30: 179-187.
- Huber-Pestalozzi, G., (Ed.) (1961). Stuttgart., E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.
- Jeffrey, S.W. (1980). En: Primary Productivity in The Sea. Falkenberg, P.G. (Ed.). New York, Plenum. pp. 33-58.
- Johnson, E.A. (1992). En: Profiles on Biotechnology. Villa, T.G. y Abalde, J. (Eds.). Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico Campus Universitario. Santiago de Compostela, pp: 289-301.
- Kobayashi, M., Kakizono, T. y Nagai, S., (1993). *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 867-73.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N. y Nagai, S., (1992). *J. Ferment. Bioeng.* 74(1): 61-63.
- Lang, N.J., (1968). *J. Phycol.* 4: 12-19.
- Lee, Y.K. y Ding, S.-Y., (1994). *J. Phycol.* 30: 445-449.
- Lee, Y.K. y Ding, S.-Y., (1995). *J. Phycol.* 31: 922-924.
- Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T., Ohtani, T. y Miki, W., (1995). *J. Bacteriol.* 177: 6575-6584.
- Nagasawa, H., Konishi, R., Yamamoto, K. y Ben-Amotz, A., (1989). *In vivo* 3: 79-82.
- Orosa, M., Franqueira, D., Torres, E., Cid, A., Fidalgo, P. y Abalde, J. (1998). En: Advances in Plant Lipids Research. Sánchez, J., Cerdá-Olmedo, E. y Martínez. Force (Eds). pp:442-445.
- Peto, R., Doll, R., Buckley, J.D. y Sporn, M.B., (1981). *Nature* 290: 201-208.
- Prézelin, B.B., Samuelsson, G. y Matlick, H.A., (1986). *Mar. Biol. (Berl.)* 93: 1-12.
- Rau, W. (1988). En: Plant Pigments.. Goodwin, T.W. (Ed.). London, Academic Press Limited. pp: 231-255.

- Renstrom, B. y Liaaen-Jensen, S., (1981). *Comp. Biochem. Physiol.* 69B: 625-627.
- Santos, M.F. y Mesquita, J.F., (1984). *Cytologia* 49: 215-28.
- Schiedt, K., Leuenberger, F.J., Vecchi, M. y Glinz, E., (1985). *Pure and Appl. Chem.* 57: 685-692.
- Skrede, G. y Storebakken, T., (1987). *J. Food Sci.* 51(3): 804-808.
- Sommer, T.R., Potts, W.T. y Morrissy, N.M., (1991). *Aquaculture* 94: 79-88.
- Tan, S., Cunningham, J.F.X., Youmans, M., Grabowski, B., Sun, Z. y Gantt, E., (1995). *J. Phycol.* 31: 897-905.
- Tjahjono, A.E., Kakizono, T., Hayama, Y., Nishio, N. y Nagai, S., (1994). *J. Ferment. Bioeng.* 77: 352-357.
- Torrissen, O.J., (1984). *Aquaculture* 43: 185-193.
- Torrissen, O.J., (1986). *Aquaculture* 53: 271-278.
- Vorst, P., Baard, R.L., Mur, L.R., Korthals, H.J. y van den Ende, H., (1994). *Microbiology.* 140: 1411-1417.
- Yokohama, Y., Hirata, T., Misonou, T., Tanaka, J. y Yokochi, H., (1992). *Jpn. J. Phycol. (Sóru)* 40: 25-31.
- Yong, Y.Y.R. y Lee, Y.-K., (1991). *Phycologia* 30(3): 257-261.
- Zlotnik, I., Sukenik, A. y Dubinsky, Z., (1993). *J. Phycol.* 29: 463-469.