

ARTÍCULOS ORIGINALES

ARQUEAS HALÓFILAS PRODUCTORAS DE BETACAROTENO AISLADAS DE LAS SALINAS SOLARES DE HUACHO-LIMA

Cynthia G. Esquerre¹, Lenin Maturrano^{1,2} y Amparo I. Zavaleta¹

¹Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM

²Laboratorio de Microbiología, Universidad de Alicante-España

RESUMEN

A nivel mundial, se ha incrementado el interés hacia la búsqueda de fuentes naturales de betacaroteno debido a su amplio uso como agente colorante y antioxidante en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética. Con la finalidad de aislar arqueas halófilas productoras de betacaroteno se tomaron muestras de sales de las salinas solares de Huacho y se sembraron en agar sea water (SWA) suplementado con NaCl al 20% y extracto de levadura al 0.5%. De los 25 microorganismos aislados se seleccionaron 12 por presentar tonos rojizos de pigmentación celular. Los aislados seleccionados fueron analizados para determinar su crecimiento celular y su capacidad de producir betacaroteno, siendo el aislado denominado W2 el que produjo el mayor índice de pigmentación celular; adicionalmente, se determinó la concentración óptima de NaCl y extracto de levadura para incrementar la producción de betacaroteno. El aislado W2 fue identificado por amplificación y secuenciación de la región variable de los genes ribosómicos 16S como *Haloferax gibbonsii* perteneciente al dominio *Archaea*, éste llegó a producir 0.6042 mg de betacaroteno/ml de cultivo a 25% de NaCl y 0.5% de extracto de levadura.

Palabras claves: arqueas, halófilas, salinas solares, *Haloferax gibbonsii*, betacaroteno, genes ribosómicos 16S.

ABSTRACT

Throughout the world, interest toward the search of natural sources of betacarotene has been increased due to its wide use as a colorant and antioxidant agent in pharmaceutical, cosmetic and food industries. In order to isolate *Archaea* halophilic betacarotene producers, salt samples from solar salterns located in Huacho were taken and cultured in sea water agar (SWA) supplemented with 20% NaCl and 0.5% yeast extract. From the 25 microorganisms isolated, 12 which presented different reddish cellular pigmentation were chosen. Selected isolates were analyzed to determine their cellular growth and ability to produce betacarotene, being the isolate W2 which obtained the highest cellular pigmentation index. Besides, optimal concentration of NaCl and yeast extract to increase the production of betacarotene was determined. Isolate W2 was identified as *Haloferax gibbonsii* of the *Archaea* domain by amplification and partial sequencing of the 16S ribosomal genes. This strain produced 0.6042 mg of betacarotene/ ml of culture with 25% NaCl and 0.5% yeast extract.

Key words: halophilic archaea, solar salterns, *Haloferax gibbonsii*, betacarotene, 16S ribosomal genes.

INTRODUCCIÓN

Los ambientes hipersalinos, como las salinas solares, albergan organismos vivientes pertenecientes a los tres dominios: *Eucarya*, *Bacteria* y *Archaea*. En muchos de estos ambientes predominan las arqueas halófilas pertenecientes a la familia *Halobacteriaceae* que comprende, hasta la actuali-

dad, 15 géneros: *Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halorubrum*, *Halobaculum*, *Natrialba*, *Natronorubrum*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Halogeometricum*, *Haloterrigena*, *Natrinema*, *Natronomonas* y *Halorhabdus*. Estos microorganismos requieren para sobrevivir como mínimo 1.5 M de NaCl y en la mayoría de los casos de 3 a 4 M de NaCl para crecer óptimamente (1 y 2).

Las arqueas halófilas son productoras de betacaroteno y otros compuestos de gran potencial biotecnológico como exopolisacáridos, enzimas, polihidroxicanoatos, bacteriorodopsina utilizada en holografía y memoria óptica, entre otros (1-6).

El betacaroteno es un colorante natural perteneciente a la familia de los carotenoides, está constituido por un esqueleto hidrocarbonado de cuarenta átomos de carbono que incluye una cadena principal de once enlaces dobles conjugados, responsable de su coloración amarilla característica (7-9). El betacaroteno es convertido en vitamina A y ácido retinoico, en su mayor parte en los intestinos y en el hígado. Cada molécula de ácido retinoico origina dos de retinol por lo que se le conoce como pro vitamina A. El betacaroteno protege a las macromoléculas celulares contra el daño oxidativo extinguiendo y depurando especies de oxígeno altamente reactivas, estimula la respuesta inmunitaria, incrementa la comunicación y diferenciación celular, previene desórdenes de fotosensibilidad (10-13), y es utilizado ampliamente en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética como colorante y antioxidante (7, 8, 9 y 13).

Las fuentes tradicionales de betacaroteno son de origen vegetal por lo que presentan problemas de disponibilidad, suministro, uniformidad y variabilidad estacional (9). En cambio los microorganismos producen betacaroteno en forma controlada; las arqueas halófilas presentan características ventajosas en la producción de estos interesantes compuestos, como crecer rápido, ser inocuos, tener la capacidad de utilizar fuentes simples de carbono y requerir condiciones no estériles durante el cultivo (4-6). En la presente investigación se presenta la obtención de carotenoides totales a partir de arqueas halófilas aisladas de las salinas solares de Huacho-Lima y se identifica al aislado W2 mediante técnicas moleculares por ser el mayor productor de betacaroteno.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento de microorganismos. Se recolectaron muestras de sales en las salinas solares de Huacho de diferentes zonas donde había ocurrido la cristalización en febrero del 2002. Se pesaron aproximadamente 5 g de cada muestra y se sembraron en 45 ml de caldo agua de sales (SW) al 20% de NaCl suplementado con 0.5% de extracto de levadura (YE) (14). Los matraces fueron incubados a 90 rpm

y 37 °C durante 7 días. Después de verificar el crecimiento microbiano, se sembraron por extensión 50 µl de estos cultivos en placas de agar SW al 20% de NaCl y 0.2 % de Agar y fueron incubadas a 37 °C durante 7 días.

Selección de microorganismos productores de carotenoides. Con esa finalidad se seleccionaron microorganismos teniendo en cuenta la pigmentación de las colonias en medio sólido. Para verificar la pureza de los cultivos se realizaron 3 siembras sucesivas de cada colonia en agar SW. Se prepararon preinóculos de cada aislado, sembrándose por separado en 5 ml de caldo SW al 20% de NaCl y 0.5% de YE durante 4 días. Se añadieron por separado 5 ml de cada preinóculo a 45 ml de caldo SW al 20% de NaCl y 0.5% de YE, los cultivos fueron incubados a 90 rpm y 37 °C durante 7 días. Transcurrido este tiempo, se determinó el crecimiento celular por espectrofotometría según la metodología descrita por Asker y Ohta (5).

Extracción de carotenoides totales. Se utilizó la metodología descrita por Oren (1) con las siguientes modificaciones: se tomaron alícuotas de 10 ml cultivo de cada matraz, se centrifugaron a 6000 rpm durante 20 minutos y se agregó 1 ml de solución acetona: metanol (1:1) dejándose reposar durante 3 horas. Se midió la densidad óptica (DO) a 490 nm. Los resultados fueron expresados como DO por ml de cultivo.

Cuantificación de betacaroteno. Para trazar una curva de calibración se prepararon soluciones estándares de betacaroteno (Sigma) en el rango de concentraciones desde 0.00625 a 0.1 mg/ml, midiéndose la DO a 497nm. Los extractos del aislado W2 en metanol: acetona fueron transferidos a 3 ml de cloroformo y se midió la DO a 497 nm de cada uno. Los resultados fueron expresados como mg de betacaroteno/ml de cultivo.

Determinación del peso celular seco. Se utilizó la metodología descrita por Frengova y col. (15), se tomaron muestras de 5 ml de cultivo de W2 y se colocaron en una estufa a 100 °C hasta que conservaron un peso constante. Los valores de peso seco fueron expresados como mg de células secas/ ml de cultivo.

Determinación de la concentración óptima de NaCl y extracto de levadura (YE) para la producción de betacaroteno y biomasa celular. Se prepararon los siguientes caldos SW con diferentes con-

centraciones de NaCl y extracto de levadura (YE): los caldos A y B contenían YE al 0.2 % y NaCl al 25% y 20% respectivamente; los caldos C y D contenían YE al 0.5 % y NaCl al 25% y 20% respectivamente. Se prepararon cultivos de 50 ml del aislado W2 con inóculos al 5% (v/v), los cultivos fueron incubados a 90 rpm y 37 °C durante 10 días. A los 4, 7 y 10 días se colectaron alícuotas de 10 y 5 ml de los cultivos para la cuantificación de betacaroteno y de la biomasa celular respectivamente, según la metodología anteriormente descrita.

Extracción de ADN genómico. Se realizó la extracción del ADN del aislado W2 según el método descrito por Benlloch y col. (16) con algunas modificaciones. La biomasa celular fue cosechada por centrifugación, se resuspendió en 1 ml de SW, se le añadió 10 µl de SDS al 10% y proteinasa K a una concentración final de 20 mg/µl y se incubó a 55 °C durante 1 hora. Los ácidos nucleicos se purificaron con volúmenes iguales de fenol-cloroformo-isoamylalcohol y se concentraron con 3 volúmenes de etanol absoluto. Finalmente, se resuspendió en Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.

Amplificación de los genes ribosómicos 16S. Se utilizaron los métodos descritos por Zavaleta y col. (17) con las siguientes modificaciones: aproximadamente 10 ng de ADN genómico fueron amplificados mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en un volumen final de 25 µl. La mezcla de reacción contenía: KCl 50 mM, Tris/HCl (pH 9 a 25 °C) 10 mM, triton X-100 0,1% (v/v), MgCl₂ 1,5 mM, desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 200 µM de cada uno, 25 pmoles de cada cebador y 1,5 U de Taq ADN polimerasa (Gibco Life Technologies). Se utilizaron cebadores universales para los dominios *Archaea* y *Bacteria* descritos por Benlloch y col (16), las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Perkin Elmer 2400) con las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo a 94 °C durante 3 minutos; 35 ciclos de: 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos. Al finalizar se efectuó una última polimerización a 72 °C durante 7 minutos. Se analizaron 2 µl del producto de PCR mediante

electroforesis en geles de agarosa al 1% con tampón TAE 1X.

Purificación de los productos de PCR y secuenciación de los genes ribosómicos 16S. Los productos de PCR fueron purificados con el kit CONCERT™ rapid PCR Purification System (Gibco Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación se realizó con el kit ABI PRISM BigDye™ Terminators v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). La secuenciación de la zona variable de los genes ribosómicos 16S fue realizada utilizando los cebadores 21f y 958r; descritos por Benlloch y col. (16).

Análisis de las secuencias e identificación de microorganismos. Las secuencias obtenidas a partir del aislado W2 fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), mediante la búsqueda avanzada del BLAST. Asimismo, para determinar la posición filogenética del aislado W2 se construyó un dendrograma de similitud con el programa CLUSTAL W del Instituto de Bioinformática Europea.

RESULTADOS

Se aislaron 25 microorganismos de los cuales se seleccionaron 12 que presentaron diferentes tonos rojizos de pigmentación celular. Se evaluó el grado de pigmentación de los aislados seleccionados relacionando la producción de carotenoides totales y el crecimiento celular. En la Tabla N.º 1 se presentan los resultados del crecimiento, producción de carotenoides totales y grado de pigmentación celular de los microorganismos seleccionados obtenidos en el caldo SW al 20% de NaCl y 0.5% de YE que fueron cultivados a 90 rpm y 37 °C durante 7 días. Los aislados W2 y H14 mostraron el mayor y el menor crecimiento respectivamente. El aislado W2 obtuvo la mayor producción de carotenoides totales y el mayor grado de pigmentación celular, por lo que fue considerado el mejor productor de carotenoides y seleccionado para ensayos posteriores.

Tabla N.º 1. Crecimiento y producción de carotenoides de los microorganismos seleccionados

Aislado	Crecimiento celular (DO 600nm)	Carotenoides totales (DO 490 nm)	Grado de pigmentación celular (DO 490/DO 600)
R7	0.87	0.0837	0.0962
H110	0.80	0.0947	0.1184
H01	0.95	0.0921	0.0969
H14-1	0.81	0.0632	0.0780
H14	0.75	0.0602	0.0827
H32-1	0.95	0.0825	0.0868
H32	0.98	0.0649	0.0662
H1-10	0.95	0.0935	0.0984
T2	0.76	0.0658	0.0866
T2-1	0.78	0.0660	0.0846
W2-1	0.94	0.0913	0.0971
W2	1.13	0.1788	0.1582

La mayor concentración de biomasa fue de 5.624 mg células secas/ml de cultivo, ésta se obtuvo en el caldo D que contenía NaCl al 20% y YE al 0.5% a los 10 días de incubación a 90 rpm y 37 °C, en cambio las menores concentraciones de biomasa fueron 1.224 y 1.824 mg células secas/ml de cultivo y se obtuvieron a los 4 días de incubación en los caldos A y B respectivamente, ambos caldos contenían YE al 0.2% (Fig. 1). La mayor concentración de betacaroteno fue 0.6042 mg/ml de cultivo y fue obtenida en el caldo C que contenía NaCl al 25% y YE al 0.5% a los 7 días de incubación a 90 rpm y 37 °C (Fig. 2).

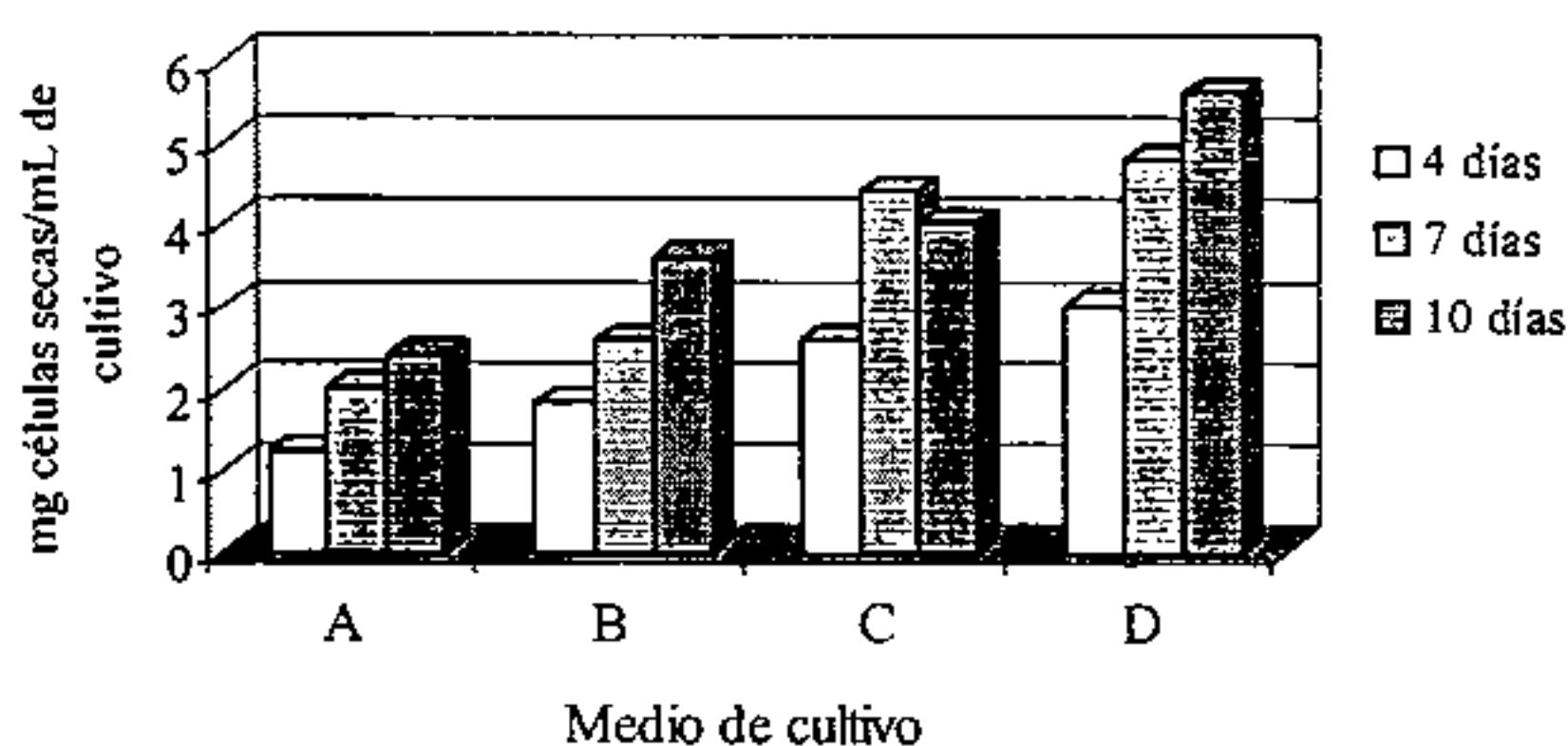


Figura 1. Producción de biomasa celular del aislado W2 en diferentes medios de cultivo.

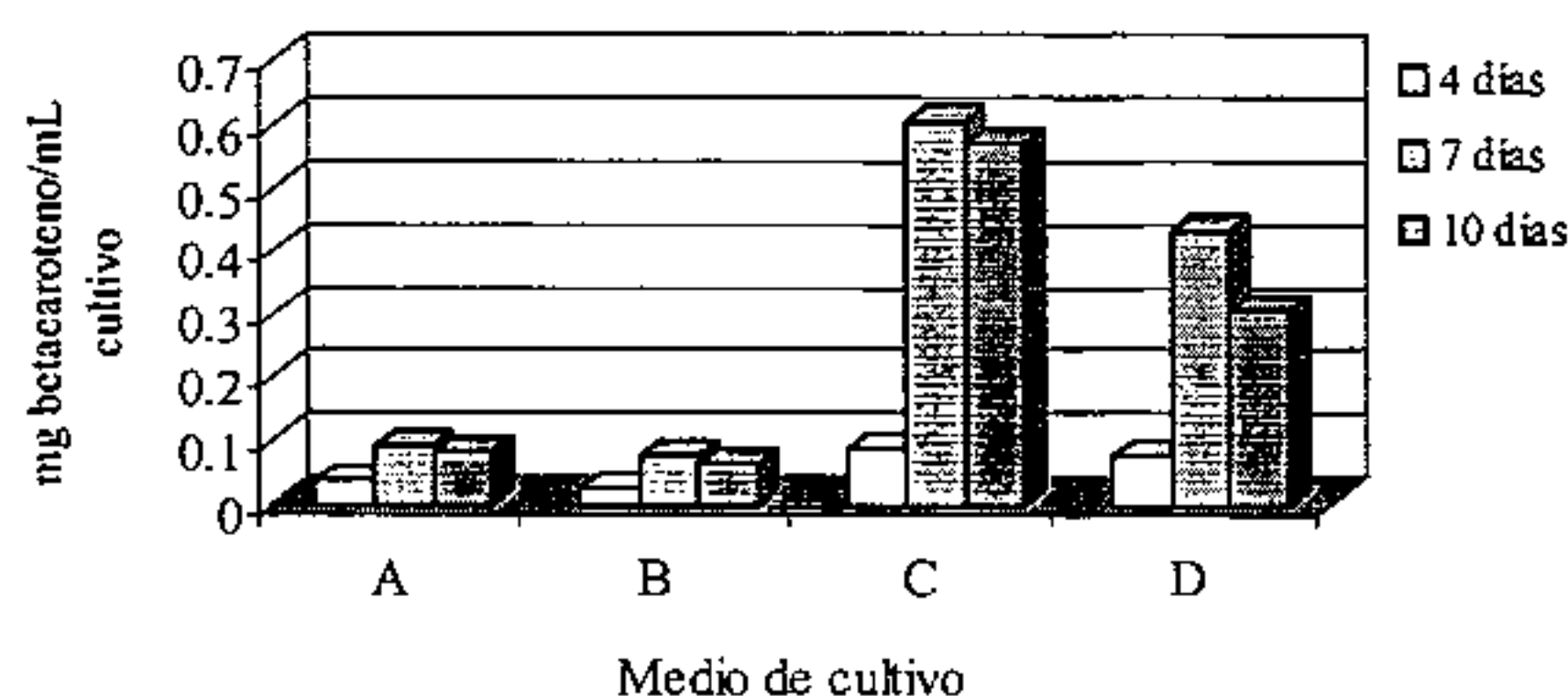


Figura 2. Producción de betacaroteno del aislado W2 en diferentes caldos de cultivo y tiempos de incubación

En la amplificación de los genes ribosómicos 16S se utilizaron cebadores para los dominios *Archaea* y *Bacteria*, pero solamente se obtuvieron productos de amplificación de aproximadamente 1500 pb para el dominio *Archaea*. Según el análisis de la secuencia obtenida de las regiones variables de los genes ribosómicos 16S, el aislado W2 mostró un 99% de similitud con la especie *Haloferax gibbonsii*, una arquea halófila adaptada a vivir en ambientes extremos con alto contenido de sales, que ha sido aislada en diferentes ambientes hipersalinos

y que comparte el mismo hábitat con otras especies de arqueas halófilas (Fig. 3). Todas las secuencias de las especies de arqueas fueron tomadas de la base de datos del NCBI, *Methanobrevibacter smithii* es una arquea metanógena que fue considerada una especie fuera de la familia *Halobacteriaceae* para valorar la consistencia del dendrograma de similitud.

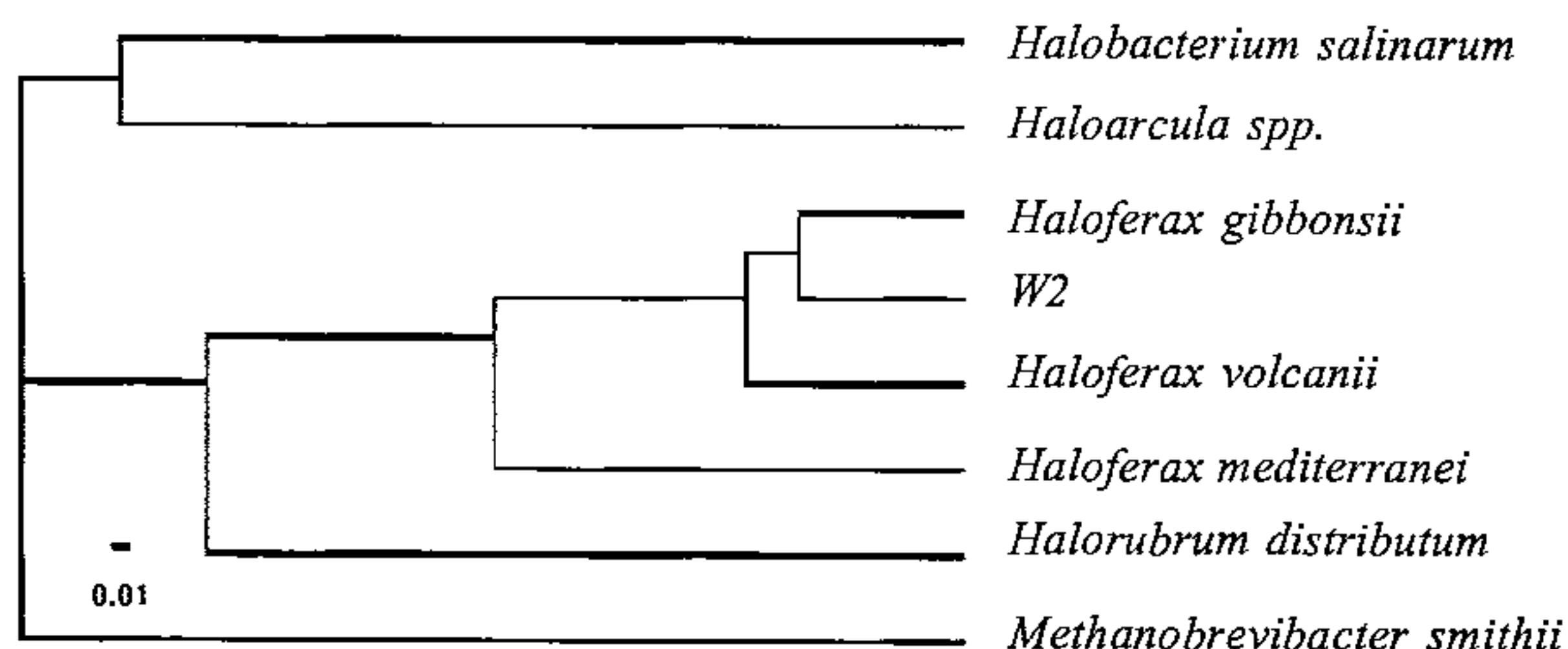


Figura 3. Dendrograma de similitud que muestra la posición filogenética del aislado W2 en base a las secuencias de los genes ribosómicos 16S

DISCUSIÓN

Con la finalidad de aislar arqueas halófilas productoras de betacaroteno se tomaron muestras de sales de las salinas solares de Huacho (Norte de Lima), un ambiente hipersalino artificial en donde se produce con fines comerciales NaCl por evaporación del agua de mar. Se aislaron 25 microorganismos, de los cuales 12 fueron seleccionados por presentar diferentes tonos rojizos de pigmentación celular, el aislado W2 fue identificado como *Haloferax gibbonsii*, este microorganismo fue capaz de producir 0.6042 mg de betacaroteno/ml de cultivo en caldo SW con alto contenido de sales, esta producción supera en forma notable a las descritas para *Rhodotorula glutinis* 0.0915 mg/g (15) y *Haloferax alexandrinus* 0.06 mg/g (5 y 6). Estas diferencias podrían deberse a la variabilidad genética intraespecífica de las especies productoras de betacaroteno, la diferente composición de sales utilizada en el medio de cultivo, y/o a los métodos de extracción y cuantificación utilizados. No obstante, cabe la posibilidad de que W2 sea una cepa de la especie *Haloferax gibbonsii* productora de las mayores cantidades de betacaroteno con respecto a las descritas hasta la fecha (1, 3, 5 y 6).

La concentración de biomasa de arqueas halófilas suele ser directamente proporcional a la concentración de metabolitos producidos como exopolisacáridos (4), sin embargo, en el presente trabajo no se encontró dicha relación, obteniéndose la mayor producción de biomasa celular 5.624 mg células secas/ml en el medio de cultivo D que contenía NaCl al 20% y YE al 0.5% a los 10 días de

incubación y la mayor producción de betacaroteno en el medio de cultivo C que contenía NaCl al 25% y YE al 0.5% a los 7 días de incubación, dichas observaciones estarían relacionadas a las concentraciones extremadamente altas de NaCl (25%) que podrían ejercer un efecto inhibitorio del crecimiento celular y/o estimulante de la producción de betacaroteno. Asker y Ohta (5 y 6) reportaron que la máxima concentración de biomasa se obtuvo en medios que contenían concentraciones en el rango del 15 al 20% de NaCl y YE al 0.5%. Además observamos que los mayores valores de biomasa se obtuvieron en los medios de cultivo que contenían YE al 0.5% independientemente del tiempo de incubación, esta observación concuerda con las afirmaciones hechas por Asker y Ohta (5), quienes sostienen que el extracto de levadura estimula el crecimiento celular de arqueas.

La mayor producción de betacaroteno fue de 0.6042 mg/ml de cultivo en el medio C que contenía NaCl al 25% y YE al 0.5% a los 7 días de incubación y 90 rpm de agitación, Asker y Ohta (5 y 6) reportaron en *Haloferax alexandrinus* la mayor producción de carotenoides totales y cantaxantina en condiciones de cultivo similares.

El aislado W2 constituye un recurso natural que presenta mayores ventajas en la obtención de betacaroteno que los vegetales, debido a las características especiales de las arqueas halófilas que faci-

litan muchos procesos biotecnológicos tales como: la capacidad de utilizar para su crecimiento fuentes de carbono simples como azúcares, succinatos y acetatos, no requerir condiciones estériles en procesos fermentativos debido a que la alta concentración de cloruro de sodio usada en el medio de cultivo previene la contaminación por otros microorganismos (3 y 5) y la facilidad de la recuperación de productos intracelulares por lisis celular en agua destilada (3-6).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Oren A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology and applications. *J. Industrial Microbiol. Biotech.* 28: 56-63.
- Antón J., Roselló-Mora F., Rodríguez-Valera F., Amann R. 2000. Extremely halophilic Bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3052-57.
- Margesin R., Schinner F. 2001. Potencial of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5: 73-83.
- Antón J., Meseguer I., Rodríguez-Valera F. 1988. Production of an Extracellular Polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 2381-86.
- Asker D., Ohta Y. 2002. Production of canthaxantin by *Haloferax alexandrinus* under non-aseptic conditions and a simple, rapid method for its extraction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58 :743-50.
- Asker, D., Ohta, Y. 2002. *Haloferax alexandrinus* sp. nov., an extremely halophilic canthaxantin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:729-38.
- Armstrong, G. A. 1997. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 629-59.
- Bruneton, J. 1991. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Editorial Limusa, S.A. Zaragoza.
- Garcia M., Quintero, R. 1993. Biotecnología Alimentaria. Editorial Limusa S.A., Mexico.
- Olson J.A. 1999. Carotenoids in human health. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 49: 7S - 11S.
- Stahl W., Ale-Agha N., Polidori M.C. 2002. Non antioxidant properties of carotenoids. *J. Bacteriol.* 11: 2889-97.
- Jyoconchi H., Hill J., Tomita Y., Good R.A. 1991. Studies of immunomodulating actions of carotenoids. Effects of betacarotene and astaxanthin on murine lymphocyte functions and cell surface marker expression in-vivo culture system. *Nutr. Cancer.* 16 : 93-105.
- Sandmann G., Albrecht M., Schnurr G., Knorz O., Boger P. 1999. The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. *Trends Biotech.* 17: 233-37.
- Rodríguez-Valera F., Juez F., Kushner D.J. 1983. *Halobacterium mediterranei* spec. nov., a new carbohydrate-utilizing extreme halophilic. *Syst. Appl. Microbiol.* 4: 369-81.
- Frengova G., Simova E., Pavlova K., Beshkova D., Grigonova D. 1994. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 888-94.
- Benlloch S., Acinas S.G., Antón J., López-López A., Luz S.P., Rodríguez-Valera, F. 2001. Archeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR. *Microbiol. Ecol.* 41: 12-19.
- Zavaleta A.I., Martínez-Murcia A.I., Rodríguez-Valera F. 1996. 16S-23S rDNA intergenic sequences indicate that *Leuconostoc oenos* is phylogenetically homogeneous. *Microbiology* 142: 2105-21.