

***Phaffia rhodozyma*: PRIMER MICROORGANISMO EXPLORADO PARA LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA**

Tomás.G. Villa, Pilar. Calo, Pilar. Blanco y Carmen. Sieiro.

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia.
Universidad de Santiago de Compostela.

L. CAROTENOIDES

Los carotenoides son compuestos poliénicos formados por 8 ó 10 unidades de isopreno (C5) con lo que se obtienen compuestos de 40 o 50 carbonos respectivamente. Una serie de dobles enlaces conjugados constituye el grupo cromóforo, cuyo máximo de absorción varía entre 400 y 500 nm y proporciona los característicos colores entre el amarillo y el rojo. La nomenclatura sistemática (IUPAC, 1971) está basada en la designación de los grupos finales de las moléculas, usando los prefijos γ (grupo acíclico final), β o ϵ (grupos ciclohexeno finales) (Fig. 1)

Los carotenoides con la cadena hidrocarbonada no sustituida (licopeno, β -caroteno, etc.) se denominan "carotenos". El término xantofilas cubre un amplio grupo de derivados oxigenados que incluye alcoholes (luteína y zeaxantina), epóxidos (violaxantina), éteres (esferoideno), cetonas (equinenona, cantaxantina, astaxantina, esferoidenona) y ácidos (torularodina) (Nelis y De Leenheer, 1989). La forma natural en la que se presentan la mayor parte de los carotenoides es la forma *trans* aunque los isómeros *cis* también aparecen en una pequeña proporción, formándose fácilmente como artefactos de los isómeros *trans*.

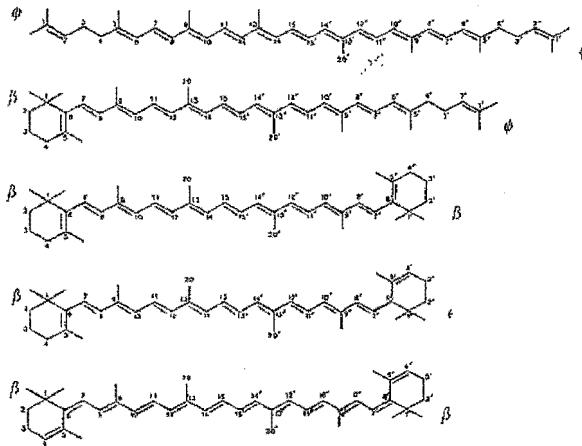


Figura 1. Estructuras básicas de los carotenoides de los cuales derivan los compuestos mencionados en la Tabla 1.

Biosíntesis de los carotenoides.

Los primeros pasos en la formación de carotenoides comienza en la ruta del mevalonato. El ácido mevalónico es el primer compuesto específico precursor de carotenoides (Britton, 1976). El esqueleto carbonado más próximo en la ruta es el isopentenil pirofosfato (ipp) (C5), y los compuestos intermediarios se forman por la unión cabeza-cola de unidades isopreno (C5) que llevan al geranilgeranil pirofosfato (C20), tras lo cual tiene lugar una condensación cabeza-cabeza de dos unidades C20 dando lugar al fitoeno, con el típico esqueleto carotenoides C40 (Figura 2). Aunque existen carotenoides C30, C45 Y C50 producidos por algunas bacterias, la mayor parte de los carotenoides son tetraterpenos C40 (Britton, 1976).

Distribución de los carotenoides en la naturaleza.

Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias, hongos, algas, animales tales como los pájaros, peces e invertebrados, así como en plantas superiores. En estas últimas, los

carotenoides determinan la coloración de órganos vegetales subterráneos (β -caroteno en la raíz de zanahoria), frutos (licopeno en el tomate), flores (astaxantina en *Adonis aestivalis* (Kamata, 1986) y *Adonis annua* (Seybold y Goodwin, 1979), criptoxantina en la caléndula), semillas (zeaxantina en el maíz), etc. Pero además se encuentran en todas las hojas verdes, aunque están ocultos por la clorofila; en otoño, al desaparecer la clorofila, contribuyen a dar al follaje una tonalidad característica que va desde el amarillo al rojo (Nelis y De Leenheer, 1989).

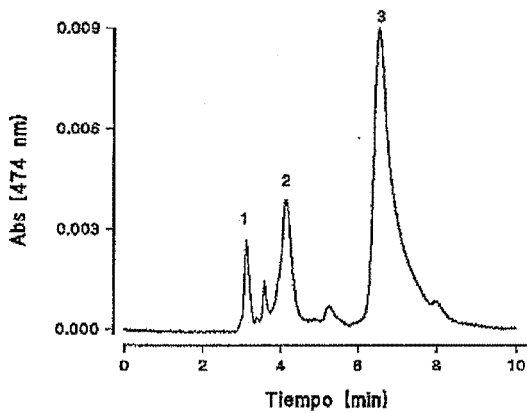


Figura 2. Análisis mediante HPLC en fase normal de los carotenoides contenidos en el pigmento extraído de una cepa silvestre (67-210) de *Ph. rhodozyma*. Los picos corresponden a: 1) β -caroteno; 2) 3-hidroxiéquinenona y 3) trans-astaxantina. Los otros picos corresponden a carotenoides intermediarios en la ruta biosintética de astaxantina.

En animales, y aunque los carotenoides están presentes en algunos pájaros y peces, se suelen asociar con los invertebrados marinos (moluscos y crustáceos). En los pájaros, los carotenoides son los responsables del color amarillo y rojo de las plumas (astaxantina en flamencos e ibis escarlata), así como del color de la piel y carne en gallinas, y especialmente de la yema de huevo. En los peces adquieren gran importancia en la carne de trucha y salmón (astaxantina y cantaxantina). En invertebrados marinos (camarón, cangrejo, langosta, etc.) la astaxantina y otros carotenoides relacionados pueden estar

presentes en concentraciones altas, a menudo como complejos carotenoproteínicos de color verde, púrpura o azul, mientras el animal está vivo; al ser cocinados estos complejos se desnaturalizan dando lugar al color rojo del carotenoide (Britton, 1992).

En el mundo microbiano, los carotenoides están presente en algas, hongos y bacterias (Goodwin, 1980). Entre los hongos destacan la cantaxantina en *Cantharellus cinnabarinus* y el licopeno en *Blakeslea trispora*. En las algas verdes cabe mencionar la luteína en *Spongiococcum excentricum* y *Chlorella pyrenoidosa* y la astaxantina en *Haematococcus pluvialis*, aspecto que será tratado en otro capítulo del presente libro. Por otra parte, en bacterias no fotosintéticas destacan el licopeno en *Streptomyces chrestomyceticus*, *subesp. rubescens*, la zeaxantina en *Flavobacterium* sp., la cantaxantina en *Brevibacterium* KY-4313 y la astaxantina en *Brevibacterium* 103.

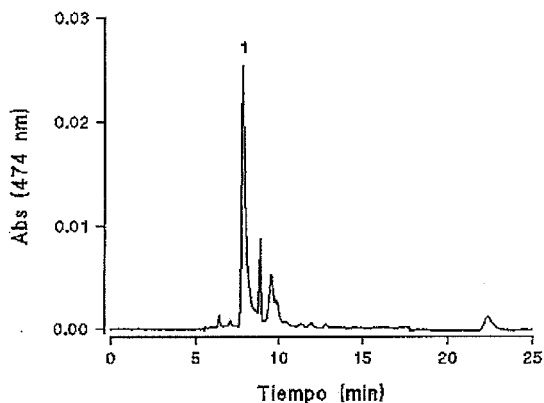


Figura 3. Análisis mediante HPLC en fase reversa del contenido carotenóidico del pigmento extraído de la cepa 67-210 de la levadura *Ph. rhodozyma*. El pico 1 corresponde a trans-astaxantina.

Entre las bacterias fotosintéticas se ha descrito la presencia de astaxantina en *Rhodococcus maris*, mientras que entre las cianobacterias se ha encontrado cantaxantina en *Anabaena variabilis*. Finalmente, destaca la presencia de astaxantina en la levadura *Phaffia rhodozyma*,

como primer ejemplo de estudio de un pigmento que ha conducido a la explotación industrial para finalmente ceder el puesto, o al menos perder liderazgo, en favor de la astaxantina obtenida más barata por síntesis química.

Los carotenoides pueden ser biosintetizados por plantas superiores, algas, hongos y bacterias. Por el contrario, se admite generalmente y sin base científica irrefutable que los animales no pueden sintetizarlos de *novo*, aunque algunos son capaces de metabolizar y modificar químicamente la estructura de algunos carotenoides que ingieren en la dieta.

Propiedades de los carotenoides.

Los principales problemas asociados al trabajo con carotenoides derivan de la inestabilidad inherente de estos pigmentos en presencia de agentes físicos (luz, oxígeno, calor) y químicos (ácidos, y en algunos casos álcalis). La exposición a la luz, y especialmente a la luz solar, y luz ultravioleta induce una fotoisomerización *cis-trans* llevando a la destrucción de los carotenoides. La temperatura tiene también importancia en la manipulación de estos pigmentos, ya que son termolábiles, por ello es necesaria la elección de aquellos solventes que presenten menor punto de ebullición; así, las fracciones ligeras del petróleo, con un punto de ebullición de 30-60 °C son preferibles a las fracciones pesadas. Los carotenoides pueden ser oxidados por oxígeno o por peróxidos, siendo particularmente sensibles a la oxidación en cromatografía de capa fina, por lo que es necesario trabajar en atmósfera inerte (Davies, 1976)

Los carotenoides cristalizan en multitud de formas (Fig.2) y el color puede variar desde el naranja-rojo al violeta o casi negro dependiendo de la forma. Su punto de fusión es alto, entre 130 y 220 °C. Incluso los cristales son sensibles a la oxidación cuando están expuestos al aire y deben ser mantenidos en atmósfera inerte o a vacío (Britton, 1992). En general los carotenoides se caracterizan por su insolubilidad en agua y su alta solubilidad en disolventes orgánicos e incluso en aceites vegetales.

Propiedades biológicas.

La presencia del grupo cromóforo en la estructura de los carotenoides tiene una función biológica en microorganismos como agente fotoprotector y antioxidante (Nelis y De Leenheer, 1989). En algas y bacterias fotosintéticas, los carotenoides participan en la captura de compuestos luminosos en el proceso fotosintético (Mathis y Schenck, 1982) y ejercen además un efecto fotoprotector (Burnett, 1976). Como antioxidantes, los carotenoides protegen los tejidos vulnerables contra los efectos de los singletes de oxígeno y los radicales libres (Krinsky, 1979). Se han descrito efectos fotoprotectores similares en las bacterias no fotosintéticas (Mathews y Krinsky, 1965).

Los carotenoides actúan en las plantas superiores como transportadores de oxígeno en la célula vegetal y, además, pueden absorber y transmitir a la clorofila la energía procedente de determinadas radiaciones luminosas. En animales, además de una función antioxidante, también parecen ejercer influencia sobre la reproducción. 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 clave estimulador de la fertilidad y de la reproducción (Schiedt, 1985). Así, animales como los flamencos, producen una secreción llamada “leche de buche” con un valor nutritivo similar a la de mamíferos que contiene el pigmento astaxantina (pigmento que coloreá las plumas de los adultos) y que aporta a la leche un color rojo vivo. El pigmento se acumula en el hígado del joven y no en el plumón que durante mucho tiempo es gris; además no tendrá conductas de ostentación ni criará hasta que adquiera la típica tonalidad rosa.

Absorción, transporte y metabolismo de los carotenoides.

Aunque y como ya hemos comentado se admite que tanto los pájaros como los peces e invertebrados no pueden sintetizar los carotenoides, sí pueden introducir ciertas modificaciones estructurales en los que obtienen a partir de la dieta. Las modificaciones más frecuentes resultan de la introducción de una función oxígeno en el anillo para producir

astaxantina, aunque los enzimas responsables de tal modificación no han podido ser aislados hasta ahora. No obstante estas transformaciones no acontecen en peces tales como el salmón. En consecuencia, la carne rosa del salmón sólo se puede obtener cuando la propia astaxantina o la cantaxantina forman parte de la dieta (Johnson *et al.* 1977). Por otra parte, y como ya se ha demostrado reiterativamente la absorción de los carotenoides presentes en la dieta de los animales se ve favorecida por la abundancia de grasas en la misma.

En general los carotenos apenas son absorbidos por las aves, pero las xantofilas sí son absorbidas en niveles apreciables y transportadas a la yema de huevo y masa muscular (Mateos, 1991) y en el caso particular de los flamencos, los carotenoides (principalmente astaxantina) son almacenados en hígado en los animales jóvenes, pasando a la pluma en la edad reproductora (Fox, 1962) de tal modo que estos animales precisan una ingesta constante de oxo-carotenoides para mantener su color rosa característico e incluso para asegurar su reproducción. En salmónidos, la absorción de los carotenoides tiene lugar a nivel del piloro (Torrissen, 1986), de donde pasa a piel y músculo y como ocurre en el caso anterior ha de ser continua su ingesta para asegurar la llegada fértil al período reproductor.

Carotenoproteínas.

Los carotenoides libres son de color amarillo, naranja o rojo, pero en algunos invertebrados marinos la astaxantina forma complejos con proteínas originando carotenoproteínas, las cuales tienen un amplio rango de colores, incluyendo el verde, azul ó púrpura. El ejemplo mejor conocido de carotenoproteína es la crustacianina, de color azul, presente en el caparazón de la langosta (*Hommarus gammarus*); este complejo absorbe radiación a 630 nm, a diferencia de los 474 nm a los que absorbe la astaxantina libre. Estos complejos carotenoproteínicos presentan propiedades tales como la de ser solubles en agua y estables al aire y a la temperatura ambiente (Britton, 1982).

Legislación.

La Unión Europea (UE) permite un amplio rango de colorantes de utilización industrial, algunos de los cuales son de origen natural. La cantaxantina está listada con el código E-161. Por otra parte, la relación de colorantes permitidos por la Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos no coincide con la europea. Asimismo en este país los colorantes de utilización industrial no llevan código ni requieren certificación, estando permanentemente listados. Una de las ventajas de los colorantes naturales es que, generalmente, se autoriza su utilización más fácilmente que en el caso de los colorantes sintéticos, asumiendo que por su misma naturaleza son inocuos mientras que los sintéticos sólo se admiten aquellas formas idénticas a la forma natural y que por su estructura no pueden ser convertidos en compuestos tóxicos.

Aplicaciones industriales de los carotenoides.

La demanda de carotenoides en el mercado es cada vez mayor, tanto como colorantes alimentarios (Kläni y Bauernfeind, 1981) como en aditivos alimentarios para pigmentación animal (Marusich y Bauernfeind, 1981). En avicultura, la alimentación de pollos y gallinas ponedoras suele estar suplementada con distintos pigmentos para favorecer la coloración amarillo-naranja de la yema de huevo y/o la piel de pollos (Marusich y Bauernfeind, 1981). Un color óptimo de la yema se consigue por adición de un pigmento base amarillo (luteína, etil éster del ácido β -apo- β' -carotenoico) y uno naranja-rojo, preferentemente un cetocarotenoide (astaxantina, cantaxantina, zeaxantina). En esta línea, la astaxantina ha mostrado una alta eficiencia en la pigmentación de huevos (Johnson y *et al.*, 1980a).

En acuicultura, la adición de cetocarotenoides tales como la astaxantina ó la cantaxantina a la alimentación de peces intensifica el color rojizo de la carne, como ya demostraron Johnson y colaboradores en 1980 para el salmón y trucha, aumentando de esa manera considerablemente el valor añadido de la producción en cultivos intensivos. Además, los carotenoides precursores de la astaxantina y la

propia astaxantina contribuyen al sabor característico del salmón (An y *et al.*, 1989).

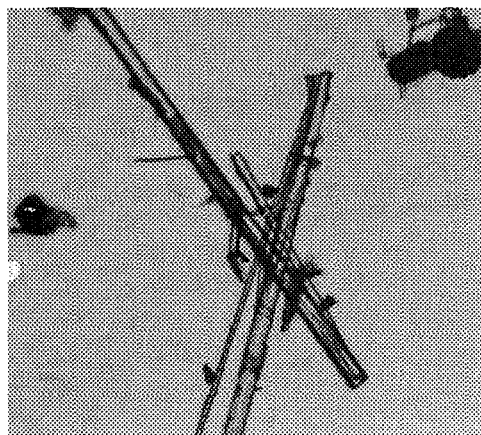


Figura 4. Cristales de astaxantina obtenidos de un extracto de éter de petróleo mantenido a -75°C durante 24 horas. Observación microscópica (x100).

Entre los carotenoides que presentan mayor demanda en la industria de salmónidos se encuentran los cetocarotenoides astaxantina y cantaxantina. La cantaxantina se obtiene actualmente y de forma mayoritaria por síntesis química. Este proceso se realizaba originalmente por oxidación del β -caroteno y, más tarde, por síntesis directa. En 1990 Nochida *et al.*, patentaron la técnica de obtención del colorante cantaxantina a partir de la bacteria *Rhodococcus sp.*. Este carotenoide se está utilizando actualmente como aditivo alimentario (E-161) en la coloración de galletas así como en cápsulas para el bronceado de la piel

El carotenoide que, con mucho, presenta una mayor eficiencia en la pigmentación de salmónidos y crustáceos y en avicultura es la astaxantina. La fuente natural de astaxantina utilizada hasta hace algunos años era la harina de caparzones de crustáceos, aunque este método pronto se abandonó después de comprobar que la levadura *Ph. Rhodozyma* acumula de forma natural principalmente este caroteno y además de forma libre, lo que facilita la preparación del pigmento (ver Tabla 2) (Johnson, 1977), siendo éste el microorganismo en el que de una

manera global la producción es más rentable que en ningún otro; actualmente comercializado como “Natupink” por Gist-Brocades. Por otra parte, Hoffman-La Roche (Basle, Suiza) ha comercializado como réplica la denominada astaxantina sintética “Carophyll pink”.

La composición carotenóidica del pigmento de la levadura *Ph. rhodozymadozyma* se indica en la Tabla 3 junto con el máximo de absorción de cada carotenoide y su Rf (An *et al.*, 1989). El carotenoide mayoritario es *trans*-astaxantina y en menor proporción O-caroteno y 3-hidroxiiequinenona.

Antecedentes históricos de la levadura *Ph. rhodozyma*.

La levadura *Ph. rhodozyma* fue aislada a principios de los años 70 a partir de exudados de árboles en Japón y Alaska (Phaff y *et al.* 1972) como una levadura de color anaranjado, de pared celular típicamente basidiomicética y que era capaz de fermentar la glucosa siendo denominado el género como *Phaffia* en honor al Prof. Herman Jen Phaff por Miller y colaboradores en 1976. En ese mismo año Andrewes y colaboradores sugieren una posible ruta biosintética para la formación de astaxantina en *Ph. rhodozyma*. Como se ha indicado, en 1977 Johnson y colaboradores estudian la aplicación de esta levadura para la pigmentación de salmónidos y crustáceos. Los mismos autores un año más tarde describen un método para la extracción de astaxantina a partir de la levadura *Ph. rhodozyma* utilizando los enzimas líticos de *B. circularis* WL-12. En 1979 se optimiza la producción de astaxantina a partir de la levadura, estudiando el pH óptimo, los nutrientes, etc y por fin en 1980 se demuestra que esta levadura es una excelente fuente de astaxantina para dietas de salmónidos, puesto que el pigmento es rápidamente asimilado y depositado en la carne de la trucha arco iris (Johnson *et al.*, 1980b), y para pigmentación de yema de huevo (Johnson *et al.*, 1980a). En 1984 se propone la autólisis de la levadura en agua destilada o en tampón citrato como un medio bastante bueno para facilitar la extracción del pigmento.

En 1989 An *et al.*, obtienen por mutación las primeras nuevas estirpes de *Ph. rhodozyma* hiperproductoras del pigmento astaxantina. En 1988 la empresa danesa Danisco-Bioteknology patenta la obtención de astaxantina a partir de esta levadura para su utilización en la alimentación de peces y otros animales. Como ya se indicó con anterioridad, la empresa Gist Brocades (Holanda) ha comercializado esta levadura como fuente de pigmento para salmónidos con el nombre de "Natupink". Recientemente se han aislado otra serie de mutantes de esta levadura tanto hiperproductores de astaxantina, como una serie de ellos que tienen como fenotipo predominante el hecho de que los carotenoides son directamente extraíbles a una fase orgánica de etanol, sin necesidad de tratamiento previo de las células (Calo *et al.*, 1995).

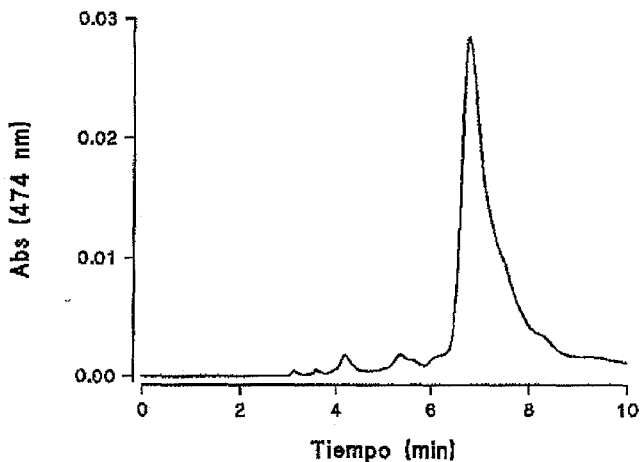


Figura 5. Análisis de la muestra de cristales de pigmento disueltos en acetato de etilo mediante HPLC. El pico corresponde a la astaxantina pura.

La obtención de astaxantina a partir de *Ph. rhodozyma* presenta algunos inconvenientes, entre los que destacan los siguientes: i) la levadura tarda unos 7 días en alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, momento en el cual es acumulada la mayor parte del pigmento; ii) la astaxantina es producida intracelularmente, asociada fuertemente a membranas celulares como se demuestra por microscopía confocal, de

modo que los animales alimentados con células intactas de la levadura no son capaces de asimilar el pigmento debido a que no pueden digerir la pared de la levadura (Johnson *et al.*, 1978). Para que la astaxantina pueda ser asimilada por el animal es necesario añadir la levadura lisada o bien un extracto del pigmento. La lisis se ha llevado a cabo utilizando los enzimas líticos producidos por *Bacillus circulans* WL-12 (Johnson *et al.*, 1978), o bien en cultivo mixto (Johnson *et al.*, 1978). Sin embargo, *B. circulans* WL-12 plantea inconvenientes tales como el estrecho rango de pH de crecimiento, lo cual implica la necesidad de reajustar el pH del medio de la segunda fermentación (recientemente se han obviado estas dificultades que entraña el uso de bacterias líticas, con el uso de hongos hiperparásitos como es el caso de *Trichoderma harzianum*); iii) La concentración de pigmento presente en aislados naturales de *Ph. rhodozyma* oscila entre los 50 y 300 µg. de astaxantina por gramo de levadura seca según la cepa. Por tanto, hay que añadir gran cantidad de levadura a la dieta para proporcionar de 50 a 200 mg de astaxantina por kg de alimento para lograr una pigmentación adecuada del salmón (An y Johnson, 1989). Este aporte relativamente alto de levaduras supone un suplemento excesivo de nutrientes que podría ser perjudicial pues según se ha encontrado produce un engorde excesivo del animal. Por esta razón, es preferible la administración tanto del pigmento aislado como de cepas de levadura hiperproductoras del pigmento astaxantina en las que la relación pigmento/biomasa de levadura sea más beneficiosa para la nutrición integral del animal.

Tecnología de extracción del pigmento astaxantina a partir de *Ph. rhodozyma*

Como se ha visto, para la extracción del pigmento es necesario romper la pared de la levadura. Para ello se pueden utilizar distintos métodos: i) ruptura mecánica por tratamiento con un homogeneizador Braun, o bien el paso a través de una prensa de French. Estos métodos son laboriosos, requieren un gran aporte de energía, y, por tanto, son de difícil aplicabilidad a escala industrial; ii) ruptura celular química por hidrólisis ácida o alcalina. Este método aunque efectivo queda totalmente

descartado y no se puede utilizar debido a que los carotenoides son sensibles tanto a ácidos como a bases ; iii) ruptura enzimática. Consiste en la destrucción de la pared de la levadura por enzimas líticas de origen microbiano. Este método fue estudiado por Johnson y colaboradores en 1978 utilizando como microorganismos productores de enzimas líticas *Bacillus circularis* WL-12. Los resultados obtenidos mostraron una elevada actividad lítica, lo cual permitía extraer fácilmente el pigmento. Este método fue estudiado por Tangeras y colaboradores en 1989.

El pigmento, una vez concentrado y disuelto en éter de petróleo, fue mantenido en congelación hasta el momento de su utilización. Al ser recogido para su fraccionamiento en TLC, se apreció la presencia de un compuesto cristalizado en la solución orgánica de carotenoides. Posteriormente y mediante filtración a través de membranas de teflón, se pudieron aislar estos cristales de, los cuales poseían forma acicular y color blanco que al ser disueltos de nuevo en fase orgánica proporcionaban el típico color asalmonado de la astaxantina. La solución obtenida tras la disolución de los cristales en acetato de etilo fue analizada mediante HPLC, comprobando que aparecía un pico único, cuyo tiempo de retención correspondía al del carotenoide astaxantina (Fig. 5).

2. OBTENCION DE NUEVAS ESTIRPES DE LA LEVADURA *Ph. Rhodozyma* Y MODULACION DE LA SINTESIS DE ASTAXANTINA.

Uno de los primeros compuestos que se utilizaron con éxito en este sentido fue el fungicida benomilo, que además , cuando se usa en dosis adecuadas, causa o induce estados permanentes de aneuploidía que puede eliminar genes dominantes supresores (común es estados silvestres) y hacer aparente algún fenotipo industrialmente útil. Primero había que determinar la dosis mínima inhibitoria de este compuesto para la levadura *Ph. Rhodozyma*. Para ello la cepa silvestre 67-210 fue sembrada en medio YM liquido, y posteriormente en placas Petri que contenían medio YM sólido suplementado con distintas concentraciones del fungicida benomilo; las concentraciones utilizadas variaron entre 0,005 y 100 mg/L.

Tras incubación, las placas mostraron crecimiento microbiano cuando la concentración del fungicida era igual o inferior a 1 mg/L. Dicho crecimiento fue medido y comparado con ensayos control, no expuestos a benomilo, de la cepa silvestre, con el fin de calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento. El valor experimental para la DL50 resultó aproximadamente 0,01 mg/L, lo cual, de acuerdo con la clasificación de Edginton (Edginton, 1970), implica que la levadura *Ph. rhodozyma* es altamente sensible al fungicida benomilo y ya sugería un estado haploide de euploidía (Calo *et al.*,1992).

Otro compuesto utilizado para tratar de obtener nuevas estirpes superproductoras de astaxantina fue el etil-metanosulfonato (EMS), para ello las células de la cepa silvestre 67-210 de la levadura *Ph. rhodozyma* fueron incubadas hasta alcanzar la fase exponencial, siendo posteriormente sometidas a mutación con EMS durante distintos tiempos encontrándose que una dosis del 4% de EMS originaba una muerte celular superior al 95% en 5 minutos. Esta cinética de mortalidad celular resultó más elevada que la descrita previamente por otros autores (An *et al.*, 1989).

Obtención de mutantes de *Ph. rhodozyma* mediante benomilo y EMS.

Las células de la cepa silvestre 67-210 de la levadura *Ph. rhodozyma* fueron incubadas hasta una densidad óptica de 0,4 y sembradas en medio YM que contenía 1 mg/L de benomilo. Se pudo comprobar la aparición de colonias a partir de los 4 días, aumentando éstas en número hasta los 12 días. La observación directa evidenció la presencia de una variedad de colonias hipo e hiperpigmentadas, entre las cuales se seleccionaron el mutante albino B1 y el mutante hiperpigmentado B10, cuyo pigmento fue caracterizado mediante HPLC.

Paralelamente se realizaron mutaciones de la cepa silvestre con EMS. Las células, tras haber sido expuestas al agente mutagénico, fueron incubadas durante 16 horas, tras lo cual fueron sembradas en placas Petri con medio YM sólido. Tras 4-5 días, se pudo apreciar la presencia de colonias correspondientes a mutantes hipopigmentados (E2, E7) e hiperpigmentados (E3, E4). Finalmente, el mutante B10, obtenido por tratamiento con benomilo, fue sometido a mutación adicional con EMS,

originando los mutantes hipopigmentados BE1, BE2 y los hiperpigmentados BE3, BE4, BE5, BE6, BE10 y BE11.

Seguidamente se procedió a la extracción de los pigmentos de cada una de las cepas descritas previamente y a la caracterización del contenido carotenóidico mediante HPLC. Los resultados obtenidos indicaron que todas las cepas sometidas a mutación con EMS con posterioridad a su tratamiento con benomilo, resultaron más sensibles a la acción del agente mutagénico EMS (más de 98% de muerte celular tras 2 minutos de exposición a EMS) que la cepa silvestre (más del 98% de muerte celular tras 5 minutos de exposición a EMS). Este resultado indica que el benomilo daba lugar a variantes genéticas menos resistentes que la cepa silvestre al mutágeno EMS.

Según esto la totalidad de las estirpes conseguidas por esta estrategia pueden agruparse en los siguientes apartados: 1) Mutantes hipopigmentados (E7, E2, B1 y BE2) que producen menor cantidad de carotenoides totales (sobre un 85-90%), pero mayores niveles de β -caroteno (entre un 240 y un 440%) y carotenoides intermediarios, siendo la astaxantina acumulada mucho menor (entre un 44 y un 64%) que la cepa silvestre de *Ph. rhodozyma*. Adicionalmente, su contenido en trans-astaxantina es muy bajo. 2) Mutantes hipopigmentados (E3 y BE7) que producen mayor cantidad de carotenoides totales (165%) que la cepa silvestre, siendo este incremento debido al aumento de carotenoides intermediarios, mientras que el contenido en astaxantina es ligeramente superior a la cepa silvestre (115%). 3) Mutantes hipopigmentados (E4, BE1 y BE4) que producen elevadas cantidades de carotenoides totales, mayoritariamente debidos a un aumento en el contenido en β -caroteno (hasta un 1.500% en el caso de las cepas BE1 y BE4), de 3-hidroxi- β -caroteno (650% en la cepa BE1), un 370% de aumento del compuesto cuyo tiempo de retención corresponde a 5,3 en la cepa BE1 y un aumento del 1.170% en el compuesto cuyo tiempo de retención corresponde a 8,4 en esta misma cepa. Todas ellas poseen menor contenido en trans-astaxantina (entre un 10% en la cepa BE1 y un 93% en la cepa BE4). 4) Mutantes hiperpigmentados (BE10, BE6, BE3 y BE11) que muestran una mayor producción de carotenoides totales (entre un 265 en

la cepa BE10 y un 370% en la BE6), debido tanto al aumento de carotenoides intermediarios como de *trans*-astaxantina (hasta un 275% en la cepa BE3). La BE1 resultó ser productora de *cis*-astaxantina. 5) Mutantes hiperpigmentados (BE5 y BE9), con un contenido mayor en carotenoides totales (hasta un 400% en la cepa BE5) que la cepa silvestre, siendo el 70% *trans*-astaxantina en la cepa BE9. La BE5 resultó ser productora de *cis*-astaxantina.

Obtención de papilas hiperpigmentadas

La cepa mutante BE2 se volvió a tratar con benomilo, mediante la exposición de las colonias a este agente durante el período de un mes en placas Petri. Tras este período se pudo comprobar que las colonias que habían perdido el color rosado pasando a ser de color crema mostraban unas papilas de color rojo intenso. Estas papilas se recogieron y se sembraron en medio fresco, siendo posteriormente extraído el pigmento y analizado mediante HPLC comprobándose una vez más de la sobreacumulación del cetocaroteno astaxantina. Es de reseñar que las cepas aisladas de las papilas mostraran mayor estabilidad genética que los otros mutantes en cuanto a la acumulación de pigmento (Tabla 5).

Con el fin de determinar la posible alteración colateral de alguna ruta metabólica en las cepas mutantes de *Ph. rhodozyma* obtenidas anteriormente, se realizaron los siguientes ensayos: i) producción de compuestos amiloideos. Este ensayo resulta distintivo de la levadura *Ph. rhodozyma*, con respecto a las otras levaduras basidiomicéticas pigmentadas. Este ensayo se basa en la aparición de un tono marrón oscuro, por adición de lugol sobre las colonias productoras de compuestos amiloideos. Por otra parte, un ensayo control con una cepa de levadura del género *Rhodotorula* (no productora de compuestos amiloideos) provoca la aparición de un color amarillo sobre la colonia. Tras la realización de este ensayo se comprobó que todas las cepas obtenidas conservaban la propiedad de la cepa progenitora de producir compuestos amiloideos. ii) Fermentación de azúcares: la levadura *Ph. rhodozyma* es la única levadura basidiomicética pigmentada que posee la propiedad de fermentar diversos azúcares. Con el fin de determinar la virtual alteración del patrón de

fermentación de azúcares en las cepas mutantes, se realizó la prueba de fermentación de glucosa. Los resultados obtenidos revelaron que, de entre las cepas mutantes descritas anteriormente, únicamente la cepa BE8 había perdido la capacidad de fermentar glucosa.

Simultáneamente se llevaron a cabo ensayos para determinar la presencia o no de un fenotipo altamente deseable, como podía ser la presencia de envueltas celulares debilitadas (fácil extracción de los carotenos por solventes orgánicos sencillos como etanol). Con este fin se realizaron ensayos orientados a la determinación de la mayor o menor dificultad en la extracción del pigmento de las cepas mutantes de la levadura *Ph. rhodozyma* obtenidas mediante benomilo y/o EMS. Dicha extracción fue realizada con disolventes orgánicos autorizados por la legislación para consumo. El disolvente de elección fue el etanol.

De este modo, y aunque la cepa silvestre *Ph. rhodozyma* 67-210 no permite la extracción del pigmento con etanol, algunos de los mutantes obtenidos a partir de esta cepa resultaron alterados en la estructura de su pared celular, de forma que una parte del pigmento que contenían pudo ser directamente extraído.

Efecto de compuestos precursores en la síntesis de astaxantina.

La estrategia de aumentar la síntesis de un determinado metabolito mediante la adición de precursores específicos ha sido una de las más antiguas en la bioquímica que ha dado excelentes resultados en los más variados procesos. Esto, junto con el advenimiento de la moderna ingeniería genética hace pensar que sin tardar mucho se dispondrán de los genes necesarios para dirigir la síntesis de astaxantina y otros carotenoides por microorganismos típicamente GRAS como es el caso de *S. cerevisiae*.

Entre otros compuestos utilizados con éxito en este sentido destaca el ácido malónico (ácido propanodioico). La exposición de la levadura *Ph. rhodozyma* a diversas concentraciones de ácido malónico no afecta el crecimiento de esta levadura, en comparación con su crecimiento en ausencia de este ácido. Por otra parte, concentraciones de ácido malónico superiores a un 1% producen una inhibición del crecimiento de la

levadura. A las concentraciones ensayadas: 1%, 0,5%, 0,1% y 0,05%, este compuesto produce una estimulación de la acumulación de carotenoides totales en *Ph. rhodozyma*. Este efecto aumenta con la dosis desde un 125% a la concentración de 0,05% hasta un 240% a la dosis de 1% de carotenoides totales (astaxantina + carotenoides intermediarios). Otro precursor utilizado con mucho éxito ha sido el ácido mevalónico. Este ácido (3,5-dihidroxi-3-metilpentanoico) es el primer precursor específico de los terpenoides. Estudios realizados con ^{14}C han permitido caracterizar la rápida disponibilidad de este compuesto y su incorporación inmediata en la cadena carbonado de los terpenos.

El crecimiento de la levadura *Ph. rhodozyma* en presencia de ácido mevalónico resultó similar al obtenido para la misma cepa en ausencia de dicho ácido. Por otra parte, concentraciones superiores a un 0,1% mostraron un efecto inhibitorio del crecimiento de la cepa ensayada, mostrando dicha concentración un efecto de estimulación de la acumulación de carotenoides totales (hasta un 590%), siendo este aumento debido al incremento de astaxantina producida.

3. COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LA LEVADURA

Ph. rhodozyma.

Diversos estudios llevados a cabo por Johnson *et al.*, (1978) y Calo *et al.*, (1995), acerca del contenido lipídico de la levadura *Ph. rhodozyma* mediante cromatografía gaseosa (GC) mostraron que la levadura *Ph. rhodozyma* contiene un porcentaje de lipidos superior al valor medio de otras levaduras (17%), como es el caso de *Rhodotorula glutinis* y *Candida utilis*, siendo la media de ácidos grasos similar a la de otras levaduras de probable origen basidiomicético (Tabla 6). Estos resultados mostraron que los ácidos grasos mayoritarios era los ácidos oleico y linoleico (insaturados), y el ácido palmítico (saturado) Por ello y en consecuencia, cabe clasificar definitivamente a esta especie de levadura como perteneciente al grupo de las oleaginosas que la hacen todavía más útil en alimentación animal.

La determinación de la composición en ácidos grasos de la cepa silvestre 67-210 de la levadura *Ph. rhodozyma* fue realizada mediante HPLC, tras ser derivatizados como fenacil ésteres, mostrando unos resultados similares a los encontrados por Johnson *et al.*, (1978) mediante cromatografía en capa fina. Así, para esta cepa, los ácidos grasos mayoritarios resultaron ser los ácidos grasos insaturados linoleico y oleico y el ácido graso saturado palmítico, y en menor proporción los ácidos grasos insaturados linolénico y mirístico, y el ácido graso saturado esteárico. También se encontró el ácido graso polinsaturado eicosapentaenoico (EPA), el cual está presente en los lípidos del salmón.

4. ASPECTOS RECIENTES RELACIONADOS CON LA MANIPULACION GENICA DE LA SINTESIS DE ASTAXANTINA.

Era evidente, al hilo de lo que se realiza rutinariamente en la mejora genética de microorganismos industriales, que antes o después se tratase de utilizar a la levadura *Ph. Rhodozyma* como receptora de genes heterólogos que dirijan la síntesis de carotenoides. En este sentido hay que destacar los trabajos del grupo del Prof. J. Verdoes de la Universidad de Wageningen. Así, se comprobó que la introducción en la levadura de los genes *crtB* y *crtZ* que controlan respectivamente para la síntesis de fitoeno sintasa y la β -caroteno hidroxilasa, aislados originariamente a partir de de la enterobacteria *Erwinia uredovora* conducía a resultados interesantes. La presencia del gen *crtB* en multicopia incrementa significativamente la cantidad relativa de astaxantina en los transformantes (multicopia génica en genes rRNA y por tanto estables en sucesivas mitosis), pero curiosamente no se llega a la producción de las cepas manipuladas por mutagénesis convencional. La expresión del gen *crtZ* redujo significativamente la cantidad de astaxantina y sin embargo no pudo detectarse zeaxantina (producto de acción de mencionado gen, en algas como *H. pluvialis*) (Kajiwara *et al.*, 1995). Esta bioconversión puede darse también en la levadura, pero sin embargo debido a la bajada en los niveles de astaxantina en todos los transformantes indican que ambos

procesos no son idénticos. Este mismo grupo ha sido capaz de aislar el gen *crtB* de *Ph. Rhodozyma* así como la región promotora. El gen tiene 4 intrones pero sin embargo no conserva bien las secuencias TACTAAC típicas de levaduras ascomicéticas para el procesado de secuencias intervenidas, sino que recuerda las secuencias de hongos filamentosos. El análisis del promotor (aunque se detectaron las clásicas TATA y señal CAP) no reveló datos particularmente interesantes y no está (como tampoco lo está el gen estructural) relacionado con los genes de otros organismos. Sirva de ejemplo que la comparación de secuencias de ambos genes entre la levadura y el moho blanco del plan *Neurospora crassa* fue solo del 26 % (Schmidhauser *et al.*, 1994). Cuando se trató de sobreexpresar el mencionado gen en multicopia alélica los resultados fueron imprecisos. Recientemente se ha realizado una librería genómica de *Ph. Rhodozyma* en YAC (Yeast Artificial Chromosome) (Jan Wery, Universidad de Wageningen, comunicación personal) pero todos los transformantes de *S. cerevisiae* no presentan color lo que indica que o bien los genes no se expresan en esta última levadura o bien que los genes no se encuentran agrupados y por tanto caerían en distintos YACs, lo que impediría un rastreo directo por color.

En definitiva, la ingeniería genética todavía no ha resuelto el tema del clonaje y sobreexpresión de los genes que controlan la síntesis de astaxantina en levaduras típicamente GRAS (recuérdese que *Ph. Rhodozyma* no tiene tal status todavía)

Tabla 1. Nombre sistemático de los carotenoides mencionados en el texto.

Nombre común	Nombre sistemático
Astaxantina	3,3'-dihidroxi- β - β -caroteno-4,4'-diona
Cantaxantina	β - β -caroteno-4,4'-diona
Foenicoxantina	3-hidroxi- β - β -caroteno-4,4'-diona
Isocriptoxantina	β - β -caroteno-4-ol
Equinenona	β - β -caroteno-4-ona
3-hidroxi equinenona	3-hidroxi- β - β -caroteno-4-ona
B-caroteno	β - β -caroteno
a'-caroteno	β - ψ -caroteno
Licopeno	ψ - ψ -caroteno
Neurosporeno	7,8-dihidro- ψ - caroteno
Zeaxantina	β - β -caroteno-3,3'-diol
Luteína	3,3'-dihidroxi- α -caroteno

Tabla 4. Contenido carotenóidico ($\mu\text{g/g}$ peso seco de levadura) de la cepa silvestre y diversas cepas mutantes de *Ph. rhodozyma* obtenidas con benomilo y/o EMS. El tiempo de retención de 3.12 corresponde a β -caroteno, el de 4.19 corresponde a 3-hidroxi-equinenona, el de 6.41 a trans-astaxantina y el de 6.62 a cis-astaxantina.

Cepa	Tiempos de retención tr (minutos)							Total
	3.12	3.60	4.19	5.32	6.41	6.62	8.35	
Blanco	20,8	9,0	39,9	14,4	181,6		1,9	274,9
E7	49.5	33.3	55.5	12.0	79.5	o	1.4	238.9
E2	51.2	28.3	48.3	12.2	94.5	o	3.1	239.5
BE1	90.0	32.2	46.7	7.8	66.1	o	0.5	244.3
BE2	55.3	16.7	41.1	15.0	116.0	o	1.9	246.7
E3	55.6	48.3	92.8	26.1	203.4	o	4.4	452
BE7	43.0	22.2	158.4	9.4	215.0	o	1.3	450.1
E4	140.5	90.6	74.5	19.4	133.4	o	4.2	514.6
BE1	307.3	174.6	66.0	11.0	18.9	o	0	660.9
BE4	358.9	81.7	105.3	18.3	169.5	o	2.8	768.5
BI0	97.8	72.2	92.8	52.2	374.5	o	8.3	750.2
BE10	139.5	73.3	120.0	17.0	338.9	o	8.1	724
BE6	237.5	68.6	177.8	24.2	449.0	o	9.5	1019.9
BE3	98.7	55.6	258.2	5.3	500.1	o	17.9	1005.6
BE11	111.1	44.6	166.5	17.8	323.9	190.6	11.1	912.6
BE5	87.5	48.3	175.9	34.4	378.9	232.3	22.2	1089.2
BE9	87.2	56.4	187.8	41.7	619.6	o	15.6	1034.1

Tabla 5. Contenido carotenoidico ($\mu\text{g/g}$ peso seco de levadura) de diferentes papilas derivadas de la cepa BE2 obtenida por mutación con benomilo y EMS de la cepa silvestre 67-210 de la levadura *Ph. rhodozyma*.

Cepa	Tiempos de retención tr (min)							Total
	3.12	3.60	4.19	5.32	6.41	6.62	8.35	
PAP3	96.5	30.4	228.4	3.9	273.4	o	3.7	636.8
PAP13	32.7	18.8	133.9	7.3	277.3	o	2.1	472.9
PAP14	33.3	18.1	150.0	5.4	295.6	o	3.1	505.5
PAP9	42.6	12.8	172.8	7.2	536.2	o	4.7	781.9
PAP11	41.7	22.8	160.0	12.2	483.4	o	2.8	724.6
PAP12	63.9	35.6	110.6	13.3	477.3	o	4.3	742.4
PAP5	23.7	5.5	76.7	7.8	415.1	o	3.1	971.9
PAP10	205.6	70.6	331.7	12.8	547.4	o	7.2	1176.4
PAP4	244.5	63.6	489.0	12.2	661.3	o	8.3	1481.5
PAP6	106.1	42.8	213.9	15.5	706.3	o	6.1	1097.5

Tabla 6. Composición porcentual en ácidos grasos determinada mediante cromatografía de gases de las levaduras *Ph. rhodozyma*, *C. utilis*, *Rh. glutinis* y *S. cerevisiae*.

Acido graso	<i>Ph. rhodozyma</i>	<i>C. utilis</i>	<i>R. glutinis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Mirístico	0,24	-	-	13,0
Palmítico	16,05	19,0	9	9,8
Paimitoleico	0,45	6,0	1	9,8
Esteárico	6,11	2,5	14	2,1
Oleico	41,3	35,0	58	26,6
Linoleico	31,7	24,0	2	0,9
Linolénico	3,0	12,0	0	-
Eicosapentanoico	1,1	-	-	-

BIBLIOGRAFÍA

- An, G. H., Schuman, D. B. y Johnson, E. A. 1989. Isolation of *Ph.rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *App. Env. Microbiol.* 55: 116-124.
- Britton, G. 1976. Biosynthesis of carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. 2nd Edition. Vol 1. Goodwin, T. W. Ed. Academic Press, London pp. 262-277.
- Britton, G. 1982. Carotenoids. In: *Actual food colorants*. Hendry G.A.F. and Houghton, J.D. Eds. Blakie. London pp. 141-182.
- Burnett, J.H. 1976. Functions of carotenoids in photosynthesis. In: *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. Vol 1. Goodwin T. W. Ed. Academic Press pp. 655-679.
- Calo, P., Velázquez, J. B., Sieiro, C. and Villa, T.G. 1995. Analysis of astaxanthin and other carotenoids from several *Ph. rhodozyma* mutants. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1396-1399.
- Davies, B. H. 1976. Carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. Vol 2. Goodwin, T. W. Ed: Academic Press pp. 38-165.
- Edgington, L. V., Khew, K. L. and Barron, G. C. 1970. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology* 61: 42-44.
- Fox, D. L. 1962. Metabolic fractionations storage and display of carotenoid pigments by flamingoes. *Comp. Biochem. Physiol.* 6: 1-40.
- Goodwin, T. W. 1980. *The biochemistry of carotenoids*. Vol 1. 2nd Edition. Chapman & Hall. London.
- Johnson, E. A., Conklin, D. E. and Lewis, M. J. 1977. The yeast *Ph. rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceous. *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 2417-2421.
- Johnson, E. A., Lewis, M. J. and Gran, C. R. 1980a. Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Ph. rhodozyma*. *Poult. Sci.* 59: 1777-1782.

- Johnson, E. A., Villa, T. G. and Lewis, M. J. 1980b. *Ph. rhodozyma* as a astaxanthin source in salmonid diets. *Aquaculture* 20: 123- 134.
- Jonhson, E. A., Villa, T. G., Lewis, M. A. and Phaff, H. J. 1978. Simple method for the isolation of astaxanthin from the basidiomycetous yeast *Ph. rhodozyma*. *App. Env. Microbiol.* 35: 1155-1159.
- Kajiwara, S., Kakizono, T., Saito, T., Kondo, K., Ohtani, T., Nishio, N., Nagai, S., Misawa, N. 1995. Isolation and functional analysis of a novel cDNA for astaxanthin biosynthesis from *Haematococcus pluvialis*, and astaxhin synthesis in *Escherichia coli*, *Plant Mol. Biol.* 29:343-352.
- Kameata, T. 1986. Study of astaxanthin diester in the flower *Adonis aestivalis* and its application for the pigmentation of rainbow trout *Salmo gardnieri*. *Disert. Abst. Int.* 47: 449-577.
- Kläni, H., Bauernfeind, J. C. 1981. Carotenoids as food colors. In: Carotenoids as food colorants and vitamin A precursors. Bauernfeind, J. C. Ed. Academic Press, New York. pp. 48-317.
- Krinski, N. J. 1979. Carotenoid protection against oxidation. *Pure Appl. Chem.* 51: 649-660.
- Marusich, W. L. and Bauernfeind, J. C. 1981. Oxycarotenoids in poultry feed. In: Carotenoids as food colorants and vitamin A precursors. Bauernfeind, J. C. Ed. Academic Press, New York. pp. 319-462.
- Mateos, G. G. 1991. Factores que influyen en la calidad del huevo. En: Nutrición y alimentación de gallinas ponedoras. Coordinadores: De Blas, C. y Mateos, G. C. Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación. Ed. Mundi-prensa. Aedos. Madrid. pp. 255-262.
- Mathews, M M. and Krinski, N. I. 1965. The relationship between carotenoid pigments and resistance to radiation in non-photosynthetic bacteria. *Phytochem. Photobiol.* 19: 217-222.
- Mathis, P. and Scherck, C. C. 1982. The functions of carotenoids in photosynthesis. In Carotenoids Chemistry and Biochemistry. Britton, G. and Goodwin, T. W. Eds. Pergamon Press, Oxford. pp. 339-347.

- Miller, W. W., Yoneyama, M. and Soneda, M. 1976. *Phaffia* a new genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). Int. J. Syst. Bacteriol. 26: 286-291.
- Nelis, H. J. and De Leenheer, A. P. 1989. Microbial sources of carotenoids other than -carotene. In: Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors. Vandamme, E. J. Ed. Elsevier Applied Science, New York pp. 43-81.
- Phaff, H. J., Miller, M. W., Yoneyama, M. and Soneda. 1972. Proceeding of the 4th IFS, Kioto. Society of Fermentation Technology, Osaka.
- Schiedt, K., Leuenberger, F.J., Vecchi, M. and Glinz, E. 1985. Absorption retention and metabolic transformation of carotenoids in rainbow trout, salmon and chicken. Pure Appl. Chem. 57: 685-692.
- Schmidhauser, T.J., Lauter, F.R., Schumacher, M., Zhou, W., Russo, V.E.A., Yanofsky, C. 1994. Characterization of al-2, the phytoene synthase gene from *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 296:12060-12066.
- Seybold, A. and Goodwin, T. W. 1979. Occurrence of astaxanthin in the flower petals of *Adonis annua* L. Nature 184: 1714-1715.
- Tangeraas, A., Maroly, T., Wahlstroem, S., Slinde, E., Totland, G. K., Hegge, E. and Sandberg, K. 1989. Release of astaxanthin from the yeast *Ph. rhodozyma* by high pressure homogenization. Int. Marine Biotech. Conf. Tokio pp. 4-6.
- Torrissen, D. J. 1986. pigmentation of salmonids: a comparison of astaxanthin and cantaxanthin as pigments sources for rainbow trout. Aquaculture 53: 245-256.