

Importancia de los pigmentos carotenoides y su aplicación en la industria

Dra. Alma Rosa Domínguez Bocanegra*

Debido a la importancia comercial de los colorantes en varias industrias como la cosmética, alimentaria, avícola y la piscícola, se han realizado múltiples investigaciones sobre el uso de los carotenoides sintéticos y naturales.

Los carotenoides cumplen importantes funciones biológicas en animales, como precursores de vitamina A, como estimulantes de la respuesta inmune (Shahaidi y col., 1998). En décadas pasadas, los pigmentos se obtenían para su comercialización a partir de fuentes naturales como extractos de plantas, animales y minerales; el consumo de los pigmentos naturales disminuyó con el descubrimiento de los colorantes sintéticos en 1856. Pero desde que Newsome (1986) demostró que algunos de los colorantes sintéticos presentaban efectos carcinogénicos y embriotóxicos, se aumentó la demanda por los pigmentos naturales (Fig. 1). De los carotenoides conocidos, sólo un número reducido se utiliza comercialmente. Entre

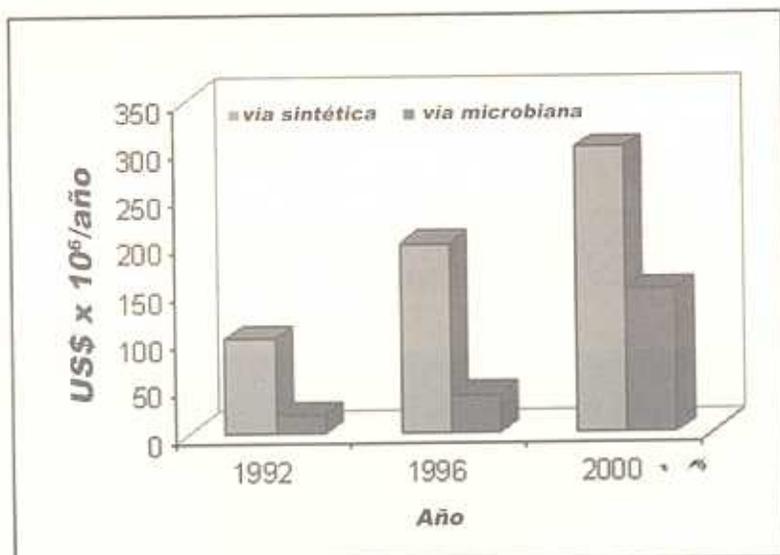


Figura 1. Producción de pigmentos carotenoides por vías sintética y microbiana.

éstos se encuentran β -caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina, criptoxantina, zeaxantina y luteína. La limitación en el número de carotenoides disponibles comercialmente se debe a la dificultad y elevado costo de su síntesis, más que a una falta de aplicación práctica.

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides liposolubles, presentes en todos los organismos fotosintéticos, cuyo color va del amarillo al rojo. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y se han identificado más de 630 de ellos. Según su naturaleza química se divi-

*Profesor-Investigador Titular A del Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. Investigador CINVESTAV-IPN, de 1992 a la fecha. Trabajo presentado para obtener el grado de Dr. en Ciencias biológicas.

den en dos grupos principales: carotenos y xantofilas, donde el β -caroteno es el principal caroteno. Entre las principales xantofilas están la zeaxantina, luteína, cantaxantina y astaxantina (Lotan y Hirschberg, 1995).

En la industria acuícola las principales xantofilas utilizadas son la cantaxantina y la astaxantina (Figura 2). La astaxantina es un constituyente importante de los alimentos para peces, debido a que el salmón y otros animales marinos no pueden sintetizarlos *de novo*, por lo que se requiere incluirlas en las dietas para obtener un color muscular rojizo, esencial en la aceptación del consumidor.

Los carotenoides tienen también aplicación en la industria cosmética (Borowitzka y Borowitzka, 1988; Haard, 1988; Borowitzka, 1999). Por otro lado, se han descrito diversas propiedades terapéuticas de los carotenoides. Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que un alto consumo de carotenoides en la dieta, disminuye el riesgo de contraer determinadas enfermedades asociadas con la formación de radicales libres. Entre dichas enfermedades se encuentran diversos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas y otros procesos degenerativos asociados con el envejecimiento.

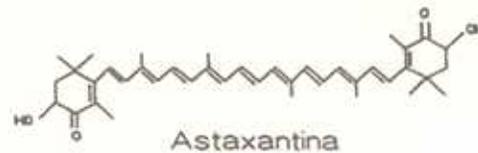


Figura 2.
Estructuras químicas de la astaxantina y cantaxantina.

La astaxantina es un pigmento carotenoides presente en animales marinos, tales como los salmones y los crustáceos, ya que estos animales no pueden sintetizar astaxantina por sí solos la toman en sus alimentos naturales, la cual es adicionada a la alimentación de los salmones, truchas y camarones cultivados para intensificar su color. La astaxantina posee una actividad antioxidante más alta que el β -caroteno y el α -tocoferol (Yamane y col., 1997). La función principal de este colorante es realizar una fotoprotección pasiva (como filtro), reduciendo la cantidad de luz disponible al complejo colector de luz del fotosistema II, minimizando el riesgo de fotoinhibición en cloroplastos (Linden, 1999).

La empresa farmacéutica Hoffman-La Roche (Basel, Suiza), ha desarrollado varios procesos para la síntesis de carotenoides. En 1964 introdujo la cantaxantina como pigmento en alimentos ("Carophyll red^{MR}") (Johnson y An, 1991). Este pigmento fue utilizado con éxito en acuicultura hasta la aparición de la transastaxantina, recientemente lanzada al mercado por Roche, la cual comercialmente recibe el nombre de "Carophyll pink^{MR}". La astaxantina sintética es la principal fuente utilizada para pigmentar el músculo de salmón, la cual es preferida por los piscicultores sobre la cantaxantina, porque se absorbe más eficientemente y da una coloración más natural y homogénea a los alimentos procesados; la astaxantina sintética procesada tiene un costo de venta de \$2,500 a \$3,500 dólares americanos/Kg (Schroeder y Johnson, 1995; Olaizola, 2000).

La astaxantina al igual que otros carotenoides, tiene un uso potencial como colorante en cosmetología, pero su inestabilidad frente a factores físicos como la luz y el oxígeno limitan su aplicación en esta área (Katsuyama y col., 1993).

A últimas fechas, se le atribuyen propiedades nutraceuticas a la astaxantina (Kobayashi y Okada, 2000), ya que presenta un alto valor nutricional. Por ser precursor de vitamina A, presenta efectos antioxidantes, por lo que protege de los daños causados por los rayos UV (Kobayashi y Sakamoto, 1999) y estimula el sistema inmunológico. Por ello, en los últimos 10 años se ha generado un interés considerable en la astaxantina y otros carotenoides al considerárseles posibles preventivos de cáncer, arteriosclerosis, cataratas y otras enfermedades degenerativas producidas por daño foto-oxidativo.

Una de las funciones más importantes de los carotenoides en organismos fotosintéticos es proteger los tejidos celulares contra radicales libres oxigenados que se producen mediante la interacción del oxígeno con la luz visible o UV, y moléculas fotosensibles como bacterioclorofila o clorofila. En las plantas, la ausencia de carotenoides induce la muerte celular por daño foto-oxidativo, de manera que son indispensables para la función fotosintética. En los microorganismos no fotosintéticos, los carotenoides también protegen a las células contra daño foto-oxidativo, en este caso mediante radicales libres producidos con la participación de otras moléculas fotosensibles como protoporfirina IX y hemo.

Por estas razones, es importante poder proponer procesos eficientes para la producción de pigmentos naturales por vía microbiana. Estos procesos pueden ser empleando la levadura *Phaffia rhodozyma* y la microalga *Haematococcus pluvialis* para la producción de astaxantina (Domínguez-Bocanegra, 2003).

Se ha determinado que ciertos parámetros afectan la síntesis de astaxantina en *H. pluvialis* como son la composición del medio de cultivo; la aireación, la temperatura y la intensidad luminosa, mientras que para la producción de astaxantina por fermentación con *P. rhodozyma* entre los parámetros más importantes están la temperatura, el pH, el nivel de oxígeno y la composición del medio de cultivo (Domínguez-Bocanegra, 2003).

Propiedades químicas y rutas biosintéticas de astaxantina a partir de la levadura *Phaffia rhodozyma* y la microalga de agua dulce *Haematococcus pluvialis*.

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona) es un oxicarotenoide y pertenece al grupo de las xantofilas. Al igual que otros carotenoides, este pigmento está formado por ocho unidades de isopreno que por condensación dan estructuras carbonadas de cuarenta átomos, llamados tetraterpenos. La fórmula molecular de este carotenoide es $C_{40}H_{52}O_4$ y posee un peso molecular aproximado de 596.86. Este pigmento fue identificado químicamente por Kühn y Sorenson (1983) y presenta forma de cristales de color violeta oscuro; su punto de fusión es de aproximadamente 224°C. Es insoluble en soluciones acuosas, pero soluble en diclorometano (30 g/L), en cloroformo (10 g/L), acetona (0.2 g/L), dimetilsulfóxido (0.5 g/L) y otros solventes polares. Es sensible a la luz, a la temperatura, a los ácidos, al oxígeno y a la presencia de álcalis. En condiciones de saponificación, sufre una conversión a astaceno. La astaxantina presenta dos carbonos asimétricos en la posición 3 y 3' (Fig. 3) y puede existir en cuatro configuraciones, incluyendo los enantiómeros idénticos (3S,3'S; 3R,3'R) y formas meso (3R,3'S; 3'R,3'S) (Müller y col., 1980).

Cabe mencionar que la astaxantina es un metabolito secundario (MS). La mayoría de los MS son moléculas orgánicas complejas que para su formación requieren un gran número de reacciones enzimáticas. Las enzimas implicadas en la producción del MS están reguladas separadamente de las enzimas del metabolito primario. Los MS, aparentemente, no son esenciales para el crecimiento y la reproducción. La formación de MS es extremadamente dependiente de las condiciones de crecimiento, en especial de la composición del medio. Con frecuencia, se produce la represión de la formación del MS y se producen como un grupo de estructuras estrechamente relacionadas. Por ejemplo, se ha visto que una sola cepa de una especie de *Streptomyces* produce 32 antibióticos distintos pero relacionados, del tipo antraciclina (Madigan y col., 1999).

P. rhodozyma es una levadura, que produce astaxantina, fue aislada al inicio de la década de los 70 a partir de los exudados de árboles de las regiones montañosas de Japón (nueve cepas) y Alaska (una cepa) (An y col., 1989) y se designó originalmente como *Rhodozyma montanae*. Más tarde se le dio el género de *Phaffia* en

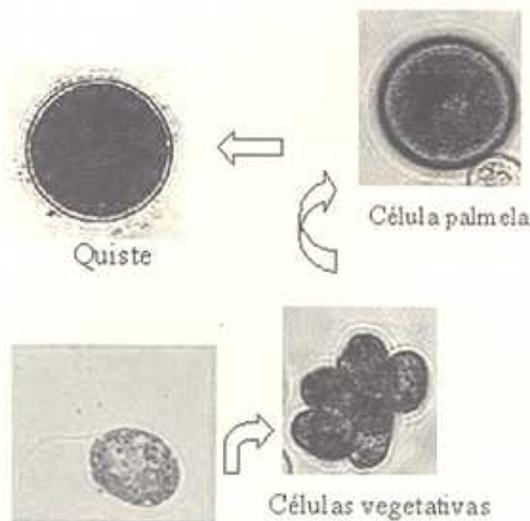


Figura 3. Ciclo de vida *H. Pluvialis*.

honor de Herman Jean Phaff, quién la describió primero (An y col., 1989).

Phaff en 1988 reconoció varias características inusuales en la levadura y estableció que las propiedades más remarcadas de este microorganismo es que las colonias son rojas o naranjas debido a la presencia de los pigmentos carotenoides. El color se debe a que sintetiza la astaxantina como su carotenoide principal. Fermenta glucosa y otros azúcares y puede ser aerobia o anaerobia (Johnson y An, 1991). *P. rhodozyma* es el estado asexual del microorganismo. Recientemente Golubev (1995) reportó el estado sexual y lo nombró *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Posteriormente los estudios moleculares de Fell y Blatt (1999) señalaron la existencia de más de una especie de *P. rhodozyma* por lo que no todas son *X. dendrorhous* (Flores-Cotera, 2001). Las cepas silvestres de *P. rhodozyma* aisladas a la fecha, contienen hasta 500 µg/g lev (0.05%) o menos en peso seco de carotenoides totales, de los cuales del 40% al 95% es astaxantina. Por lo que para hacer económicamente factible la producción comercial fue necesario obtener mutantes con un contenido mayor de astaxantina. Por ello, se ha dedicado un considerable esfuerzo de investigación a la obtención de cepas hiperproductoras. El contenido de astaxantina varía considerablemente dependiendo de la cepa y del método de cultivo (Domínguez-Bocanegra, 2003).

Extensos estudios durante los últimos 50 años han establecido que los rasgos generales de la formación de carotenoides son similares en plantas superiores, algas, hongos y bacterias (Flores-Cotera, 2001). Los carotenoides

comparten las etapas iniciales de síntesis con las vías biosintéticas de una gran variedad de isoprenoides, incluyendo sesquiterpenos, giberelinas y esteroides. El isopentil pirofosfato (IPP) es el precursor de todos ellos (Disch y col., 1998). La vía más conocida para la producción de astaxantina a partir de *P. rhodozyma* es la vía del mevalonato, que a partir del acetil-CoA produce IPP teniendo como intermediarios la hidroximetilglutaril CoA sintetasa y reductasa (HMGS y HMGR).

La vía del mevalonato se encuentra regulada para proveer las cantidades necesarias de isoprenoides y para evitar una acumulación de intermediarios.

El mevalonato sufre reacciones de fosforilación para formar el isopentil pirofosfato el cual se condensa con una molécula de dimetil-pirofosfato (DMAPP) para dar geranyl-pirofosfato. Adiciones sucesivas de moléculas de isopentenil-pirofosfato dan origen a farnesil-pirofosfato. Este último sufre una segunda adición de isopentenil-pirofosfato para formar geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP), molécula que al condensarse forma fitoeno, que es el primer precursor de los carotenoides. En organismos no fotosintéticos, una sola enzima lleva a cabo las desaturaciones para transformar el fitoeno en neurosporeno. Después, una ciclasa actúa sobre los extremos de ésta molécula para producir en varios pasos al β-caroteno (Goodwin, 1971).

H. pluvialis es una microalga verde de agua dulce del Phylum *Chlorophyta*, clase *Chloroficea*, orden *Volvocales*, familia *Haematococaceae*, género *Haematococcus* y especie *H. pluvialis*. El pigmento en *H. pluvialis* fue llamado "haematocromo" desde 1944, cuando Tisher identificó astaxantina como el carotenoide principal.

Esta alga puede existir en tres formas celulares: a) macrozoides biflagelados verdes con fototaxia positiva, es decir, que poseen un movimiento orientado hacia la fuente luminosa (Cantatore y col., 1989); b) etapa de palmela, que contiene una pequeña cantidad de astaxantina en la región perinuclear y, c) aplanosporas no móviles, de paredes gruesas que se tornan completamente rojas (Figura 2) debido a la gran acumulación de astaxantina en el citoplasma (Borowitzka y col., 1991; Lee y Ding, 1994). *H. pluvialis* acumula hasta un 3% de astaxantina en peso seco (Kobayashi y col., 1993).

En los últimos seis años, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN y en el Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, se han realizado diferentes proyectos de investigación para la obtención de pigmentos carotenoides a partir de *P. rhodozyma* y

H. pluvialis a nivel laboratorio, obteniendo excelentes resultados hasta el momento, por lo que el siguiente paso que se pretende dar, es escalar el proceso a nivel planta piloto para su comercialización. ☺

Bibliografía

- An, G.H., Schuman, D. B. y Johnson E. A. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. **Appl Environ Microbiol.** 55: 116-124.
- Borowitzka, M. A. y Borowitzka, L. J. (1988). *Dunaliella*. En: Borowitzka, M. A. y Borowitzka, L. J. (Eds.), **Micro-algal biotechnology**, Cambridge University Press, Cambridge.
- Borowitzka, M. A.; Huisman, J. M. y Osborn, A. (1991) Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. 1. Effects of nutrients on growth and cell type. **J Appl Phycol.** 3:295-304.
- Borowitzka, M.A. (1999). Comercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **J Biotechnol.** 70:313-321.
- Disch, A., Schewender, J., Müller, C., Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M. (1998). Distribution of the mevalonate and glyceraldehydes phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6714. **Biochem J.** 333:381-388.
- Domínguez-Bocanegra A. R., Guerrero-Legarreta, I., Martínez-Jerónimo, F. Y Tomassini-Campocoso, A. (2003). Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Biores Technol.**
- Fell, J. W., Blatt, G. M. (1999). Separation of strains production of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA, IGS and ITS sequence analysis. **J Ind Microbiol Biotechnol.** 23:677-681.
- Fleno, B., Christensen, Y., Larsen, R., Johansen, S. R. y Johnson, E. A. (1994). Astaxanthin producing yeast cells, methods for their preparation and their use. US Pat. 5, 356, 810.
- Flores-Cotera, L.B. (2001). Influencia de factores nutricionales en la producción de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.
- Golubev, W.I. (1995). Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Yeast.** 11:101-110.
- Goodwin, T. W. (1971). Biosynthesis En: Isler, O... (Ed) **Carotenoids**. Birkhauser-Verlag, Basel. 577.
- Haard, N. (1988) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. **Biotechnol Lett.** 10:609-614.
- Johnson, E. A. y An, G. H. (1991). Astaxanthin from microbial sources. **Crit Rev Biotechnol.** 11: 297-326.
- Katsuyama, M., Hagi, M. y Yamamoto (1993). Cosmetic application of astaxanthin .10th. International Symposium on Carotenoids, Oslo Noruega.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S. (1993). Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate induced cyst cells of to green alga *Haematococcus pluvialis*. **Appl Environ Microbiol.** 59:867-873.
- Kobayashi, M. y Sakamoto Y. (1999). Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnol Lett.** 21:265-269.
- Kobayashi M; y Okada, T. (2000). Protective role of astaxanthin against U.V.-B irradiation in the green alga *Haematococcus pluvialis* **Biotechnol Lett.** 22(3): 177-181.
- Kühn, R. y Sorenson, N. A. (1983). Über astaxanthin and ovoeridin. **Ber. Dtsch. Chem. Ges.** 71:1879.
- Lee, Y.K. y Ding, S.Y. (1994) Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). **J Phyco.** 30:445-449.
- Linden, H. (1999) Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation. **Biochim Biophys Acta.** 1446:203-212.
- Lorenz R. T; Cysewski G. R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends in Biotechnol.** 18:160-167.
- Lotan, T. y Hirschberg, J. (1995). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding β -C-4-oxygenase, that converts β -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. **FEBS Lett.** 364:125-128.
- Madigan, M. T., Martiniko, J. M., Parker, J. (1999). Brock. **Biología de los microorganismos**. 8ª Edición, Madrid, España, 234-245.
- Muller, R. K., Bernhard, K., Mayer, H., Ruttimann, A. y Vecchi, M. (1980). Beitrag zur analytische und synthese von 3-hydroxy-4-oxocarotinoiden. **Helv Chim Acta.** 63: 1654.
- Newsome, R.L. (1986). Food colors. En: **Food Techl** 49-56.
- Olaizola, M. (2000) Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. **J Appl Phycol.** 12: 499-506.
- Shahaidi, F., Metusalach, S., Brown, J.A. (1998). Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. **Crit Rev Food Sci Nutr.** 38:1-67.
- Schroeder, W. A. y Johnson, E.A. (1995). Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. **J Ind Microbiol.** 14: 502-507.
- Yamane, Y., Higashida, k. y Nishio, N. (1997) Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-bath cultures. Kinetic and stoichiometric analysis. **Appl Environ Microbiol.** 63:4471-4478.