

# Carotenoides: Estructura, Función, Biosíntesis, Regulación y Aplicaciones

ANGELES SÁNCHEZ,\* LUIS B. FLORES-COTERA, ELIZABETH LANGLEY, RUTH MARTÍN, GABRIELA MALDONADO Y SERGIO SÁNCHEZ.

*Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, Ciudad Universitaria, México 04510 D. F. México.*

\*Autor para la correspondencia: Tel. 56-22-38-67. Fax 56-22-38-55. E mail angel@info.biomedicas.unam.mx

**ABSTRACT.** Carotenoids are the most widely distributed pigments in nature. They are produced by all photosynthetic anoxygenic bacteria, photosynthetic oxygenic cyanobacteria, and by some species of non-photosynthetic bacteria. Many eukaryotes, including all algae and plants, and some fungi also produce carotenoids. Carotenoids play an important biological role in non-photosynthetic tissues giving color to fruits and flowers, and even in non-carotenogenic organisms such as mammals, birds, fish, insects, and crustaceans. Presently, carotenoid research encompasses very diverse areas including physiology of plants and microorganisms, food science, chemical synthesis, biotechnology, and medical investigation, among others. This report introduces the study of carotenoids, reviewing physical and chemical properties, chemical synthesis, biosynthesis and regulation, genetic manipulation of producing strains as well as industrial and medical applications of carotenoids.

**Key Words:** Carotenoids, Pigment, Photosynthesis.

**RESUMEN.** Los carotenoides son los pigmentos más ampliamente distribuidos en la naturaleza, son producidos por las bacterias fotosintéticas anoxigénicas, por las cianobacterias fotosintéticas oxigénicas y por algunas especies de bacterias no fotosintéticas. También los producen muchos eucariotes incluyendo las algas y plantas, y algunos hongos. En tejidos no fotosintéticos, los carotenoides proporcionan color a flores y frutos, y aún en organismos no carotenogénicos como mamíferos, aves, peces, insectos y crustáceos, estos pigmentos tienen un papel biológico importante. En la actualidad las investigaciones sobre los carotenoides abarcan diversas áreas como la fisiología de plantas y microorganismos, la ciencia de los alimentos, la síntesis química, la biotecnología y la investigación médica, entre muchas otras. En este trabajo se introduce al estudio de los carotenoides revisando las propiedades físicas y químicas, la síntesis química, la biosíntesis y su regulación, el mejoramiento genético de cepas productoras, así como sus aplicaciones.

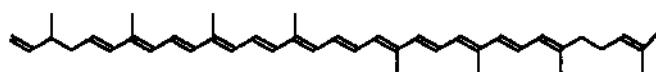
**Palabras Clave:** Carotenoides, Pigmentos, Fotosíntesis.

## INTRODUCCIÓN

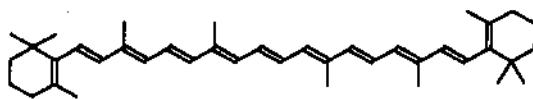
Los carotenoides son tetraterpenos, compuestos de 40 átomos de carbono, formalmente derivados del fitoeno. Pueden ser de dos clases: los carotenos, compuestos hidrocarbonados, y las xantofilas, derivados oxigenados de los carotenos.<sup>1,2</sup> En la Fig. 1 se muestran dos estructuras básicas de los carotenoides, el licopeno y el  $\beta$ -caroteno. El esqueleto hidrocarbonado del licopeno puede ser modificado por la ciclización de uno o de ambos extremos de la molécula, dando lugar a los diferentes grupos terminales ilustrados en la Fig. 2. De este modo, el  $\beta$ -caroteno y otros carotenos pueden modificarse por oxidación dando lugar a las xantofilas aumentando así su poder de pigmentación (Fig. 3). Tradicionalmente los carotenoides han sido llamados con nombres triviales, usualmente refiriéndose a la fuente de la cual se aislaron por primera vez. En la actualidad se ha establecido un esquema sistemático para denominarlos

describiendo su estructura de acuerdo a las reglas de la IUPAC. En esencia el nombre específico se refiere a la raíz "caroteno", precedida por el prefijo de las letras griegas que distinguen a los dos extremos de la molécula de acuerdo con los grupos ilustrados en la Fig. 2. En la tabla 1 encontramos el nombre trivial y sistemático de algunos carotenoides mencionados en el texto. Adicionalmente, se consideran también carotenoides algunos compuestos que tienen poco menos de 40 átomos de carbono. Se les denomina norcarotenoides cuando los carbonos que le faltan a la molécula son de la parte interna del esqueleto, y apocarotenoides cuando los carbonos que le faltan son de los extremos de la molécula.<sup>1,2</sup>

La cadena poliénica que constituye a los carotenoides es más estable en su conformación extendida. Dos factores son los responsables de esto: primero, un sistema conjugado es más estable cuando los enlaces son coplanares y en segundo lugar, el impedimento estérico de los enlaces C=C



### Licopeno



### $\beta$ -Caroteno

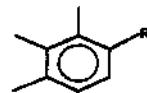
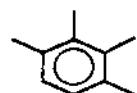
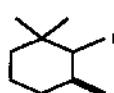
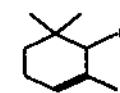
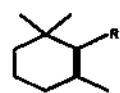
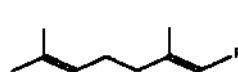
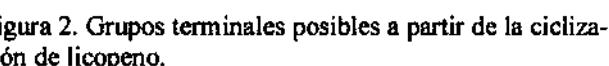


Figura 1. Estructuras básicas de las que derivan la mayoría de los carotenoides lineales y cíclicos.



en conformación "trans" es mínimo.<sup>59</sup> Los carotenoides como grupo, son moléculas extremadamente lipofílicas con poca o nula solubilidad en agua. Por ello, su localización está restringida a áreas hidrofóbicas de las células, excepto cuando están asociados con proteínas o están substituidos por grupos polares fuertes, en cuyo caso pueden encontrarse en ambientes acuosos.<sup>4</sup>

La propiedad de los carotenoides de absorber la luz se deriva de la presencia de enlaces dobles conjugados que conforman un cromóforo largo. Un cromóforo que contiene siete o más enlaces dobles conjugados posee la capacidad de absorber luz en la región visible, por esto podemos observar colores que van del amarillo al rojo, incluyendo el naranja.<sup>13</sup> Este mismo sistema poliénero hace a la molécula extremadamente sensible a la degradación oxidativa y a la isomerización inducida por la luz, el calor y los ácidos.<sup>59</sup>

Las propiedades químicas y físicas de los carotenoides *in vivo* pueden modificarse por interacciones con otras moléculas.

léculas en su microambiente, por ello las propiedades de los carotenoides libres o en solventes orgánicos son significativamente diferentes. Estas interacciones con otras moléculas, especialmente proteínas, pueden ser cruciales en su función biológica.<sup>13,34</sup> En el caso de las xantofillas, es frecuente encontrarlas como una mezcla compleja de ésteres de ácidos grasos, especialmente en las semillas, aunque también se les encuentra como derivados glicosilados en algunos microorganismos.

Muchas de las funciones de los carotenoides son consecuencia de su capacidad para absorber la luz, por lo que su papel natural es dar color. Sin embargo, también está bien establecida su función como antioxidantes en los organismos fotosintéticos y en muchos no fotosintéticos aerobios, participando en la desactivación de radicales libres que se producen durante el metabolismo normal de las células. La cadena poliénica de los carotenoides es altamente reactiva y rica en electrones, consecuentemente, en presencia de

Tabla 1. Nombre trivial y sistemático de algunos carotenoides.

Nombre trivial	Nombre sistemático
Auleraxantina	1',16'-Dideshidro-1',2'-dihidro- $\beta$ -y-caroten-21-ol
Astaxantina	3,3'-Dihidro-4,4'-diceto- $\beta$ -caroteno
Cantaxantina	4,4'-Diceto- $\beta$ -caroteno
$\alpha$ -Caroteno	$\beta$ , $\epsilon$ -Caroteno
$\beta$ -Caroteno	$\beta$ , $\beta$ -Caroteno
Fitoeno	7,8,11,12,15,7',8',11',12',15'-Octahidro-y,y-caroteno
Licopeno	y,y-Caroteno
Luteína	$\beta$ , $\epsilon$ -Caroten-3,3'-diol
Zeaxantina	$\beta$ , $\beta$ -Caroten-3,3'-diol

Tabla 2. Algunos genes que participan en la biosíntesis de carotenoides.<sup>3,4,5,56</sup>

Función enzimática	Gen	Organismos
<b>Formación de fitoeno y sus precursores</b>		
GGPP sintasa	<i>CrtE</i> <i>gds</i> <i>idsA</i> <i>al-3</i>	Algunas eubacterias Arqueobacterias ( <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> ) Arqueobacterias ( <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> ) Hongo ( <i>Neurospora crassa</i> )
Fitoeno sintasa	<i>crtB</i> <i>al-2</i> <i>PSY1, PSY2, Y1</i>	Algunas eubacterias Hongo ( <i>Neurospora crassa</i> ) Algunas plantas superiores
Diapofitoeno sintasa	<i>crtM</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>Formación de licopeno o neurospreno</b>		
Fitoeno desaturasa (Tipo CrtI)	<i>crtI</i> <i>al-1</i> <i>carC</i> <i>PDH</i>	Eubacterias con excepción de cianobacterias Hongo ( <i>Neurospora crassa; Phycomyces blakelyanus</i> ) Hongo ( <i>Cercospora nicotianae</i> )
Fitoeno desaturasa (Tipo CrtP)	<i>crtP</i> <i>PDS</i>	Algunas cianobacterias Algunas plantas superiores
Diapofitoeno desaturasa	<i>crtN</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
z-Caroteno desaturasa	<i>crtQ</i>	<i>Anabaena sp. PCC7120</i>
<b>Formación de b-caroteno</b>		
Licopeno ciclase (Tipo Crt-Y)	<i>crtY</i>	Algunas eubacterias
(Tipo Crt-L)	<i>crtL</i>	Cianobacteria ( <i>Synechococcus sp.</i> PCC7942)
<b>Formación de xantofillas acíclicas</b>		
Hidroxineurosporeno sintasa	<i>crtC</i>	Algunas eubacterias
Metoxineurosporeno desaturasa	<i>crtD</i>	Algunas eubacterias
Hidroxineurosporeno o-metiltransferasa	<i>crtF</i>	<i>Rhodobacter capsulatus y R. sphaeroides</i>
Esferoideno monooxigenasa	<i>crtA</i>	<i>Rhodobacter capsulatus y R. sphaeroides</i>
<b>Formación de xantofillas cíclicas y xantofillas glucosiladas</b>		
b-Caroteno hidroxilasa	<i>crtZ</i>	Algunas eubacterias
Zeaxantina glucosidasa	<i>crtX</i>	Algunas eubacterias
b-C-4-Oxigenasa	<i>crtW</i>	Algunas eubacterias
Capsantina-capsorubina sintasa	<i>CCS</i>	Planta ( <i>Capsicum annuum</i> )

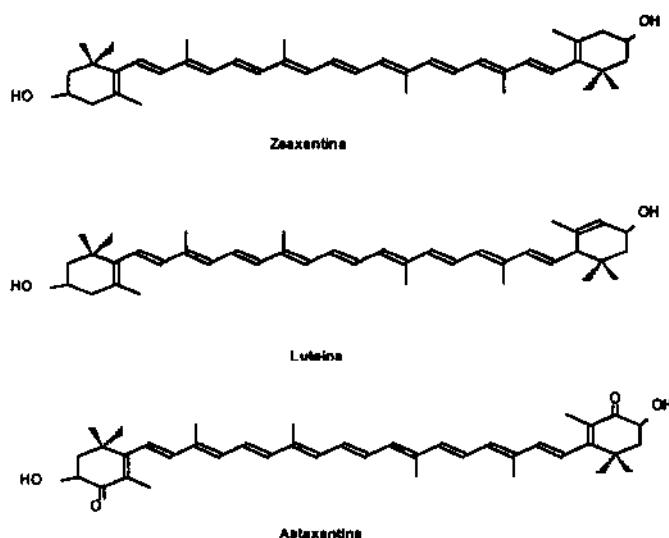


Figura 3. Algunas xantofillas de importancia comercial.

oxidantes fácilmente forman radicales libres de vida corta.<sup>59</sup> Se sabe que los radicales libres, como el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e hidroxilo ( $^{\cdot}\text{OH}$ ), son especies altamente reactivas capaces de iniciar la peroxidación de lípidos, de inactivar proteínas, o de causar daño en moléculas de DNA o RNA. En microorganismos y plantas se ha demostrado que los carotenoides inactivan  $^1\text{O}_2$ , radicales  $^{\cdot}\text{OH}$ , peróxidos y otros oxidantes mediante un proceso en el que se transfiere la energía de altos niveles de excitación a un triplete del carotenoide. Este último puede regresar a su estado basal liberando calor, pero en otros casos pueden adicionarse grupos hidroxilo al triplete o formarse epóxidos, apocarotenos o apocarotenales, con la consecuente modificación de la molécula original.<sup>13,16,34</sup>

## BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES

Los carotenoides comparten las etapas iniciales de su biosíntesis, con las vías de síntesis de una gran variedad de isoprenoides y sus derivados: monoterpenos, sesquiterpenos, giberelinas y esteroles. El isopentenil pirofosfato (IPP) es el precursor de todos los isoprenoides.<sup>17</sup> La vía de biosíntesis más conocida de IPP es la del mevalonato (Fig. 4), que a partir de acetil-coenzima A produce IPP, teniendo como intermediarios la hidroximetilglutaril CoA (HMG-CoA) y el mevalonato. La formación de IPP por esta ruta se ha descrito en animales, plantas, hongos y bacterias.<sup>17</sup>

Una vía alternativa descubierta recientemente parte de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato teniendo como intermediarios la hidroximetiltiamina y la D-1-desoxixilulosa (Fig. 4). Esta vía se ha descrito en eubacterias,<sup>55</sup> en el alga verde

*Scenedesmus obliquus*,<sup>58</sup> en las plantas superiores,<sup>39</sup> en algas unicelulares y en la cianobacteria *Synechocystis*.<sup>17</sup> El IPP proveniente de estas vías, en muchos casos se isomera a dimetilalil pirofosfato (DMAPP), al cual se le adicionan secuencialmente tres moléculas más de IPP para formar geranil-geranil pirofosfato (GGPP). Los intermedios formados durante estas adiciones son precursores de una gran variedad de isoprenoides.<sup>3,5,6,23,33</sup> A partir de GGPP existen una gran variedad de rutas de formación para carotenoides y xantofillas dependiendo de cada organismo, lo que hace imposible una generalización, sin embargo a continuación se describen algunas de las vías conocidas.

En la tabla 2 se muestran algunos de los genes involucrados en la síntesis de carotenoides en diferentes organismos. La condensación de dos moléculas de GGPP produce el fitoeno, que es el primer precursor de los carotenoides de 40 átomos de carbono. En organismos no fotosintéticos, una sola enzima del tipo CrtI lleva a cabo las desaturaciones para transformar el fitoeno en neurosporeno y posteriormente en licopeno. En organismos fotosintéticos participan dos clases de enzimas, la primera del tipo CrtP produce  $\zeta$ -caroteno y la segunda una enzima  $\zeta$ -caroteno desaturasa produce el licopeno (Fig. 5).<sup>3,4</sup>

La mayoría de los organismos carotenogénicos producen carotenoides cílicos que se forman con la participación de ciclasas, las cuales actúan sobre los extremos de la molécula del licopeno para producir  $\beta$ -caroteno o  $\alpha$ -caroteno. La síntesis de los dos anillos tipo  $\beta$ -ionona del  $\beta$ -caroteno requieren de una sola enzima, mientras que la síntesis del  $\alpha$ -caroteno requiere de dos enzimas, una para cada uno de los anillos,  $\beta$  y  $\epsilon$  respectivamente.<sup>4,56</sup> El  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno son los precursores de la mayoría de las xantofillas naturales y de sus derivados glicosilados. En *Erwinia herbicola* la producción de zeaxantina y derivados glicosilados a partir de  $\beta$ -caroteno, requiere de hidroxilasas, oxigenasas y glucosidasas.<sup>4,5,28</sup> (Fig. 6). Algunas bacterias como *Rhodobacter* y *Mixococcus*, acumulan xantofillas acíclicas que se forman a partir del neurosporeno (Fig. 7).<sup>28</sup> En el caso de *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodobacter sphaeroides*, se requieren sintetasas, desaturadas, oxigenasas y metiltransferasas para la producción de esferoideno y esferoidena.<sup>3,4,28</sup>

## REGULACIÓN

En organismos fotosintéticos, una de las funciones más importantes de los carotenoides, es la de proporcionar protección contra la combinación potencialmente dañina del oxígeno con la luz visible o UV, y con moléculas lipofílicas fotosensibles como bacterioclorofila o clorofila. La presencia de carotenoides es obligatoria para la actividad fotosintética, un ejemplo de su importancia es la muerte inducida por daño fotooxidativo, de plantas sensibles al herbicida norflurazon, un inhibidor de la desaturación del fitoeno.<sup>4,5</sup> En los microorganismos no fotosintéticos, los

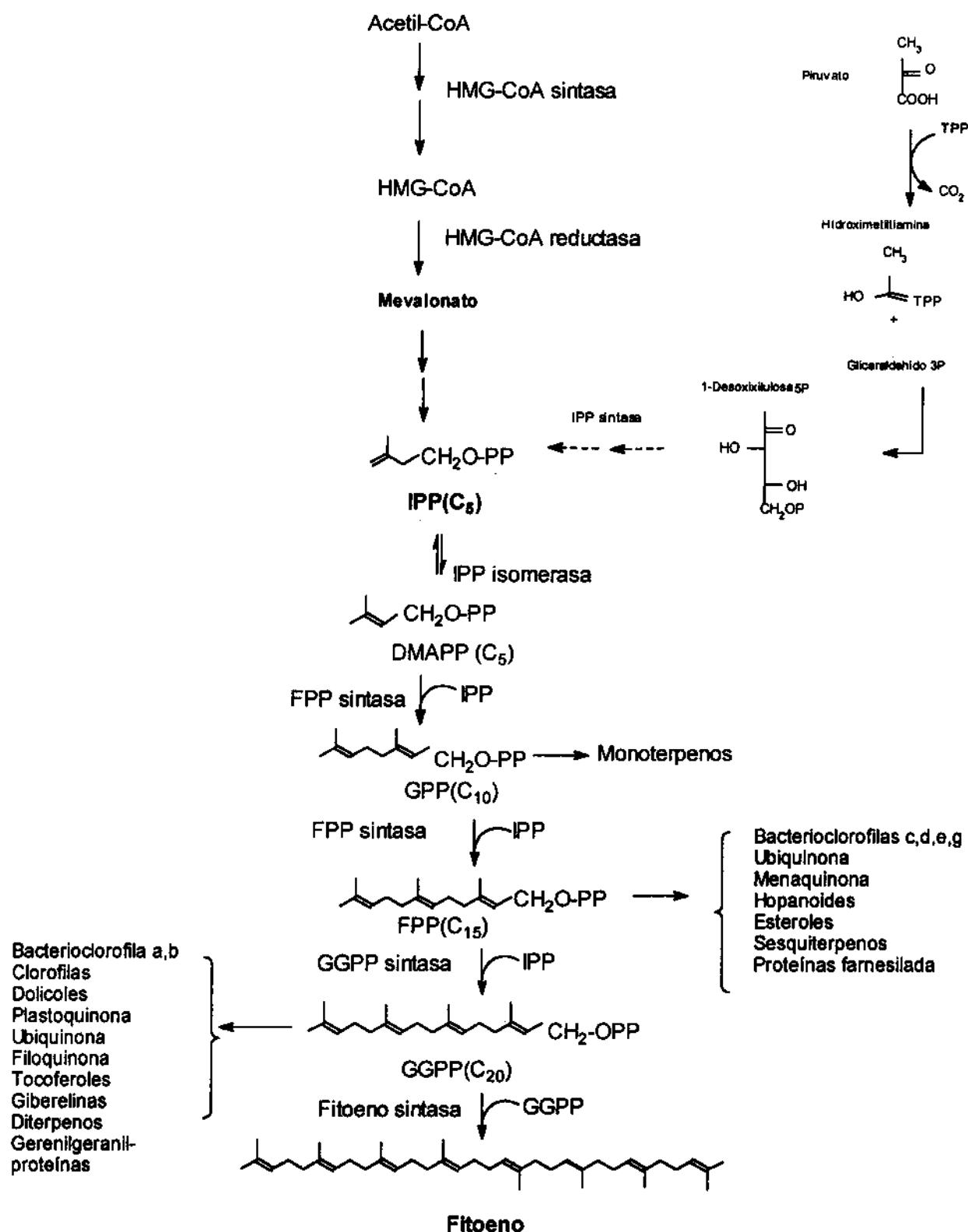
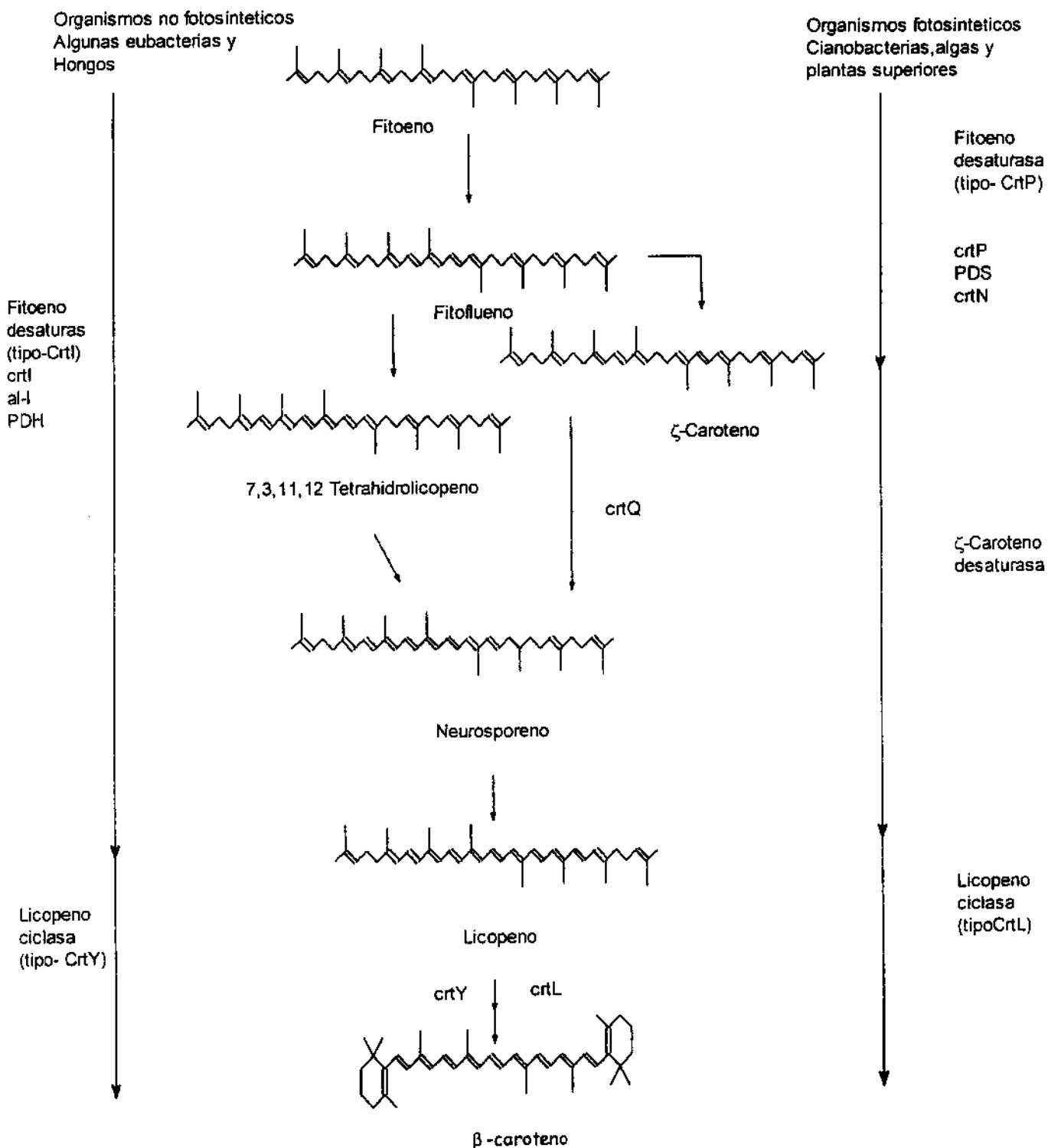


Figura 4. Biosíntesis de fitoeno por la vía del mevalonato y vía alternativa a partir de piruvato. (HMG-CoA) hidroximetilglutarilcoenzima A, (IPP) isopentenil pirofosfato, (DMAPP) dimetilalil pirofosfato, (GPP) geranilpirofosfato, (FPP) farnesilpirofosfato, (GGPP) geranilgeranilpirofosfato.

Figura 5. Biosíntesis de  $\beta$ -caroteno a partir de fitoeno, en organismos fotosintéticos y no fotosintéticos.

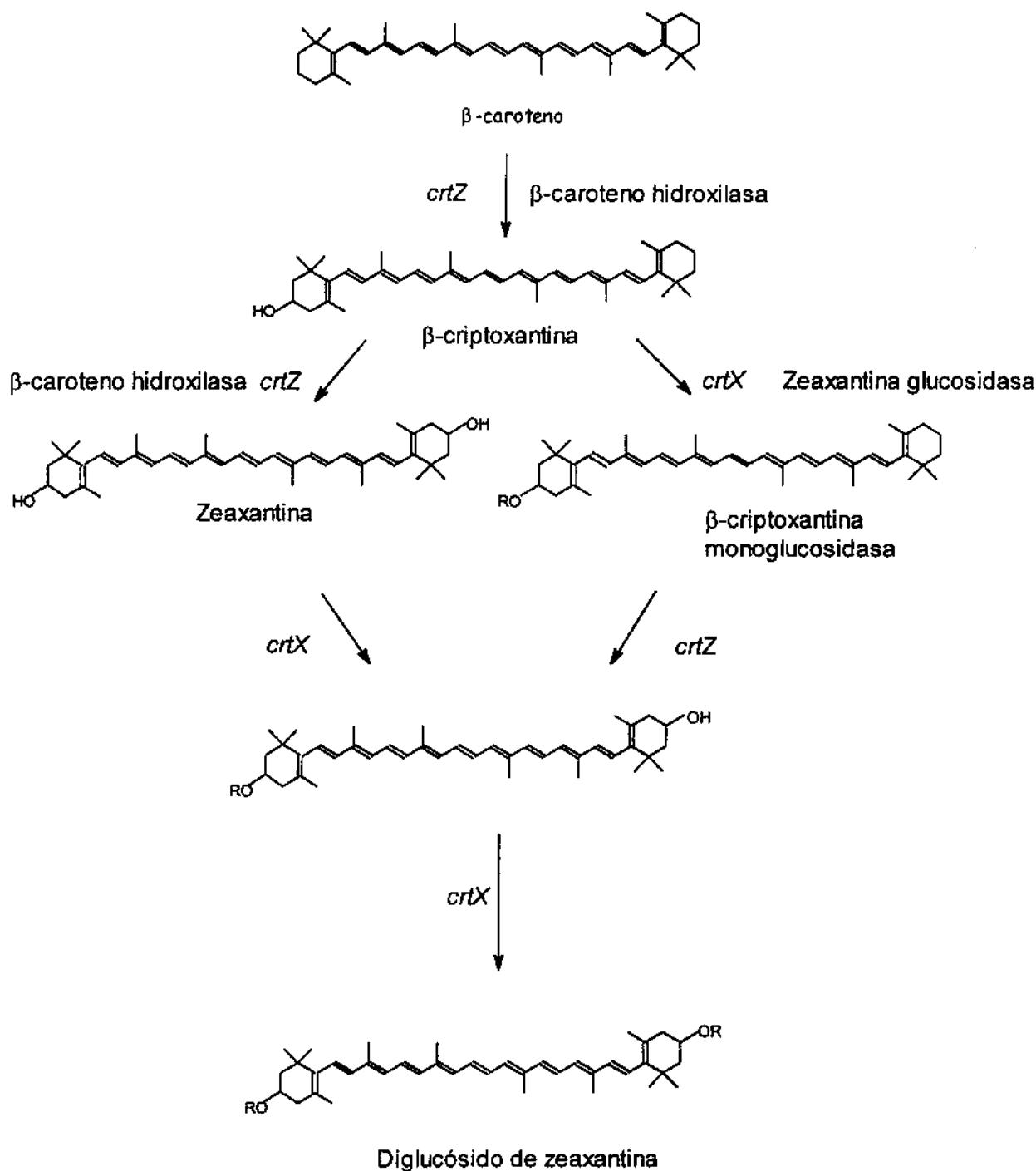


Figura 6. Biosíntesis de xantofílas y derivados glicosilados en *E. herbicola*.

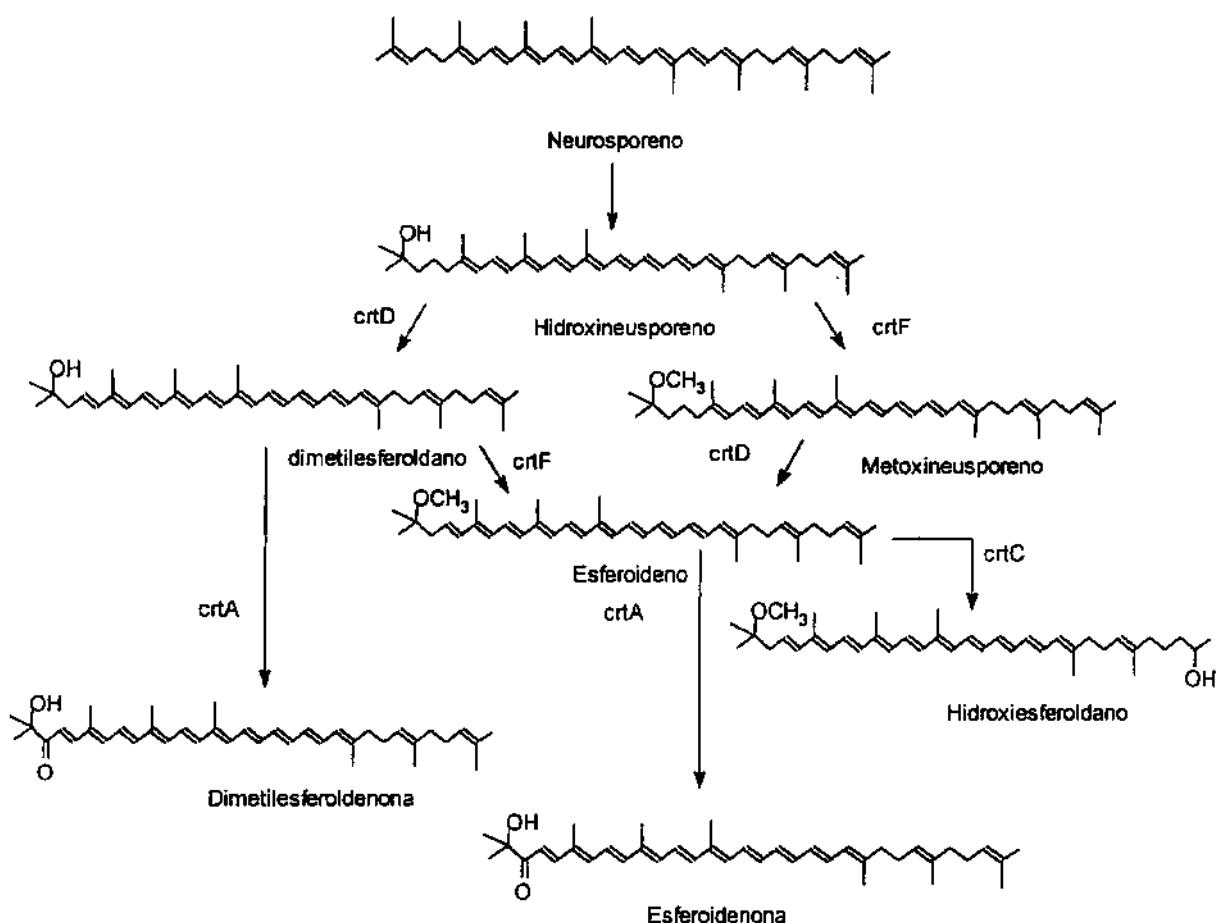


Figura 7. Biosíntesis de xantofilas acíclicas en *R. capsulatus* y *R. sphaeroides*.

carotenoides ofrecen una protección similar contra daño fotooxidativo mediado por otras moléculas fotosensibles como protoporfirina IX y hemo. Se ha sugerido que el oxígeno singulete es el principal agente oxidante en sistemas biológicos.<sup>35</sup> La capacidad de los carotenoides para inactivar eficientemente a los radicales libres, explica su presencia como pigmentos accesorios en todos los organismos fotosintéticos y su amplia distribución entre las bacterias y hongos no fotosintéticos.<sup>3</sup> En *Phaffia rhodozyma* se ha propuesto que el  ${}^1\text{O}_2$  y los radicales peróxido inducen la biosíntesis de astaxantina.<sup>32</sup> Otros factores que inducen la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* incluyen a la antimicina y otros inhibidores de la cadena respiratoria, sin embargo esta inducción, podría estar mediada por la formación de especies de oxígeno reactivas (EOR), ya que al bloquear la cadena respiratoria, las flavoproteínas reducidas son capaces de autooxidarse liberando  $\text{H}_2\text{O}_2$ .<sup>66</sup> En la bacteria no fotosintética *Mixococcus xanthus* al menos dos operones *carBA* y *crtI*, codifican para las enzimas biosintéticas. Se ha propuesto que la inducción de estos genes involucra la producción de  ${}^1\text{O}_2$  en una protoporfirina IX

fotoactivada por luz azul. El  ${}^1\text{O}_2$  interacciona con un anti-factor s (*carR*), que libera un factor s de RNA polimerasa (*carQ*), iniciándose así una cascada regulatoria en la que participan las proteínas regulatorias *carS*, *carA* y *carD*, que activan 20 y 400 veces respectivamente a los genes *carBA* y *crtI* inducibles por la luz. Al aumentar la concentración de carotenoides, el  ${}^1\text{O}_2$  producido por la protoporfirina IX es desactivado por los carotenoides y en consecuencia la expresión de los genes *carBA* y *crtI* es reprimida completamente así el ciclo regulatorio.<sup>3</sup>

Por otro lado, las bacterias fotoautotróficas facultativas del género *Rhodobacter* acumulan una mezcla de esferoideno y esferoidenona, xantofilas que son esenciales durante la transición de la respiración aeróbica a la fotosíntesis, al disminuir la concentración de oxígeno en presencia de una baja iluminación. En *R. capsulatus* y *R. sphaeroides* los genes de la fotosíntesis (*bch* y *puf*) y los 7 genes necesarios para la biosíntesis de los carotenoides (*crt*) están localizados en un mismo operón, que se expresa únicamente a bajas concentraciones de oxígeno o en anaerobiosis. En estas bacterias los productos de los genes *ppsR* y *tpsO*



reprimen la expresión de los genes *bch*, *crt* y *puc* en condiciones aeróbicas.<sup>3</sup>

La regulación de la carotenogénesis por producto final o bien por algún intermediario de la biosíntesis es un mecanismo común. En levaduras, la enzima HMGCoA reduc-tasa que participa en las etapas iniciales de la síntesis de isoprenoïdes, está regulada por intermediarios tempranos (retroregulación) y por intermediarios tardíos de la ruta de los isoprenoïdes (regulación cruzada).<sup>26</sup> En *Phycomyces blakesleeanus* un mecanismo principal de regulación de la síntesis de  $\beta$ -caroteno es por producto final, el cual parece operar a nivel de síntesis de proteínas y es mediada por un complejo de b-caroteno y los productos de los genes *carS* y *carA*.<sup>8,31</sup> Por otro lado, los estudios *in vitro* muestran que la actividad de las enzimas fitoendesaturasas de *P. blakesleeanus* y de *Synechococcus* es modulada por los carotenos subsiguientes de la vía. La mayor inhibición ocurre con el producto más desaturado, el licopeno. Una menor desaturación o la presencia de anillos  $\beta$ -ionona producen una inhibición menos efectiva.<sup>56</sup>

Otro mecanismo que regula la síntesis de carotenoides es la represión catabólica por glucosa. En algunas cepas de *E. herbicola*, así como en *Escherichia coli* transformada con los genes *crt* de *E. herbicola*, la biosíntesis es reprimida por glucosa mediante un mecanismo dependiente de AMPc. Sin embargo, este efecto no se observó en todas las cepas de *E. herbicola* que se probaron.<sup>3</sup> El efecto de la represión catabólica de la carotenogénesis también se ha observado en cepas nativas de *P. rhodozyma*<sup>32</sup> y en *M. xanthus*.<sup>3</sup> Otros factores como los cambios en la velocidad de crecimiento, la edad del cultivo, la limitación de algún nutriente, la aireación, etc. afectan la síntesis de carotenoides en hongos, pero en la mayoría de los casos los mecanismos implicados no han sido estudiados en detalle.<sup>1,4,11,31,56</sup>

## MEJORAMIENTO GENÉTICO DE LA PRODUCCIÓN MICROBIANA DE CAROTENOÏDES

La producción de carotenoides depende en gran medida de la capacidad de síntesis del microorganismo, por esto, se ha dedicado un considerable esfuerzo al aislamiento de mutantes sobreproductoras. Las mutantes espontáneas sobreproductoras de carotenoides han sido muy difíciles de obtener y en algunos casos, como en la producción de  $\beta$ -caroteno, éstas nunca se han podido aislar. Por esto se han utilizado diferentes mutágenos: físicos como la luz ultravioleta (UV), químicos como la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) o bien biológicos como lo es la inserción de transposones (Tn5) para inducir mutaciones. Los microorganismos productores de carotenoides presentan diferente sensibilidad a cada uno de estos agentes mutagénicos y con frecuencia se observa que algunos aislados, sobreviven mejor a un mismo agente mutagénico.<sup>2</sup> En la mayoría de los casos, las variantes obtenidas por mutación pueden ser reconocidas por simple inspección visual,

pero en otros casos el método de selección juega un papel primordial. Las mutantes sobreproductoras de carotenoides han sido aisladas en condiciones adversas para la producción, por ejemplo, cuando las mutantes de *Phycomyces* inducidas con NTG se hacen crecer en la oscuridad, fácilmente pueden observarse colonias sobreproductoras de carotenoides de color rojo y amarillo intenso, las cuales se distinguen del amarillo pálido de la cepa original.<sup>15</sup> Las mutantes rojas de *Phycomyces* tienen afectado el gen *carR*, necesario para la conversión de licopeno a  $\beta$ -caroteno, estas mutantes acumulan 2.5 mg de licopeno/g de peso seco. Las mutantes amarillas, producen  $\beta$ -caroteno hasta en 6 mg/g de peso seco y están afectadas en el gen *carS*, implicado en la retroregulación por producto final. También se observó que con la formación de heterocariones, entre mutantes independientes, se incrementan los niveles de producción entre 4 y 6 veces para  $\beta$ -caroteno y licopeno, respectivamente.<sup>48</sup>

Las cepas silvestres de *M. xanthus* requieren de luz para la biosíntesis de carotenoides, sin embargo, se han obtenido mutantes que producen carotenoides en ausencia de luz.<sup>40,41</sup> Una de estas mutantes produce el doble de carotenoides debido a una alteración del gen *carR*, que codifica para un regulador negativo del sistema. Otra de las mutantes produce colonias anaranjadas en la oscuridad, es cist-dominante y presenta una lesión en el gen *carA*, que es el responsable de la expresión constitutiva del gen inducible por la luz *carB*. La mutante *carA* acumula casi 6 veces más fitoeno en la oscuridad y 3 veces más en presencia de luz en comparación con la cepa silvestre, pero en presencia de luz se producen los mismos carotenoides que en la cepa original, aunque la concentración se incrementa en un 100%. El fenotipo anaranjado que presenta esta mutante en la oscuridad posiblemente se debe a que acumula un poco de neurosporeno.

Se han ensayado diversas estrategias de selección en la búsqueda de mutantes sobreproductoras de astaxantina de *P. rhodozyma*. Para la selección de mutantes, inducidas con NTG, An y col. (1989)<sup>2</sup> emplearon varios inhibidores de la biosíntesis de esteroles como cetoconazol, miconazol, 2-metil imidazol, nicotina, nistatina o inhibidores del transporte de electrones como antimicina A, cianuro de potasio, peróxido de hidrógeno y otros. De entre estos compuestos, la antimicina A fue la más efectiva para el aislamiento de sobreproductoras, lográndose el aislamiento de mutantes capaces de acumular >2,000 mg de astaxantina por g de levadura. El mecanismo por el cual la selección en antimicina aumenta la formación de astaxantina no se conoce aún. Se ha propuesto que la síntesis se desencadena debido al aumento de la formación de especies reactivas de oxígeno al bloquear la cadena respiratoria a nivel de citocromo b. Además, en virtud de que las mutantes aisladas en antimicina parecen hidroxilar y desaturar los intermediarios de carotenoides de manera más eficiente que la cepa original, se ha sugerido también que al bloquear la cadena respiratoria se activa una vía de oxidación alterna que podría estar



involucrada en la síntesis de los grupos oxigenados de la astaxantina con la mediación del citocromo P450.<sup>29,61</sup>

### SOBREPRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES A TRAVÉS DE LA CONSTRUCCIÓN DE CEPAS RECOMBINANTES

Recientemente se han reportado la clonación y las secuencias de los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides de *R. capsulatus*, *E. herbicola*, *Erwinia uredovora*, *Synechococcus* y *M. xanthus*. Estos avances han tenido importantes implicaciones y hacen cada día más atractiva la manipulación genética de microorganismos para propósitos biotecnológicos.<sup>3,14</sup> Una estrategia ha sido clonar los genes de un microorganismo productor de carotenoides y expresarlos en otro no productor pero que pudiera tener ventajas de expresión o en su cultivo. En este sentido, introduciendo los genes *crtB*, *crtE* y *crtY* de *E. uredovora* en *Zymomonas mobilis*, se ha logrado que ésta sintetice β-caroteno. La recombinante de *Zymomonas* es útil en la producción de etanol, y la biomasa que contiene 220 µg/g de peso seco de β-caroteno puede emplearse en la alimentación de aves.<sup>46</sup> Así mismo, los genes involucrados en la síntesis de zeaxantina, obtenidos a partir de *E. herbicola* y *E. uredovora*,<sup>45,53</sup> han sido clonados y expresados en *E. coli* como fragmentos de 12.4 y 6.9 Kb respectivamente. Otros ejemplos de genes clonados incluyen los de *Mycobacterium aurum* para la síntesis de leproteno<sup>27</sup> y los de *R. capsulatus* para la síntesis de la esferoidenona.<sup>24</sup>

Otra estrategia, consiste en combinar los genes de diferentes microorganismos, creando recombinantes que son capaces de sintetizar nuevos carotenoides. Hunter y col. (1994)<sup>28</sup> han insertado en un solo microorganismo, los genes involucrados en la síntesis de carotenoides de *E. herbicola* y de *R. capsulatus*, resultando una cepa recombinante capaz de producir dihidroesferoidenona, deshidrorodopina y cloroxantina, pigmentos que no son sintetizados por las cepas originales. A pesar de que los genes clonados generalmente se insertan junto con un promotor capaz de expresarse constitutivamente, esto no necesariamente asegura una alta producción de carotenoides debido a que la síntesis y la actividad de las enzimas, producto de la clonación, podrían estar sujetas a otros mecanismos normales de regulación. Por ejemplo, una cepa recombinante de *E. coli* contenido un plásmido con los genes para la síntesis de zeaxantina (pPL376), produjo sólo un 32% más que la cepa original de *E. herbicola*, pero mantuvo su sensibilidad a la regulación por glucosa.<sup>57</sup> Becker-Hapak y col. (1997)<sup>7</sup>, lograron incrementar 2.5 veces la producción de zeaxantina en esta misma cepa recombinante, al introducir una mutación en el gen *oxyR*, que funciona como sensor al estrés oxidativo y como activador transcripcional de la respuesta al estrés. La expresión de genes de la biosíntesis de carotenoides de eubacterias y eucariotes en huéspedes heterólogos ha creado interesantes posibilidades, sin embargo, para

alcanzar niveles elevados de carotenoides, aún quedan otros obstáculos por resolver. La sobreproducción de pigmentos requiere no solamente de mutantes apropiadas y de sus recombinantes, sino que además deben ser consideradas las condiciones nutricionales y de fermentación apropiadas. La adecuada composición y optimización de estos factores, combinados con los estudios de escalamiento del proceso, podrán asegurar una adecuada expresión de los sistemas clonados.

### PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES NATURALES

Durante mucho tiempo se han usado extractos de plantas como fuentes de carotenoides, en especial de β-caroteno y xantofilas. Los concentrados de maíz, alfalfa y flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) entre otros, se venden como pigmentos para usos diversos. Los extractos de la flor de cempasúchil son una fuente importante de luteína y zeaxantina, en los Estados Unidos y en México.<sup>19,31,42,50,67</sup> La bixinia se extrae de las semillas del árbol de achiote (annatto), mientras que la capsantina y capsorubina se encuentran en la oleoresina del fruto del pimentón (páprika). Aunque los vegetales siguen siendo fuentes importantes de carotenoides naturales, varios procesos microbiológicos se han explotado comercialmente desde los años setentas para la producción de β-caroteno y más recientemente de astaxantina. El cultivo del alga *Dunaliella salina* para la producción de β-caroteno se inició en Australia e Israel. Posteriormente la producción se estableció en otros países con condiciones climáticas apropiadas como los Estados Unidos, Rusia, Chile, España y China.<sup>10,31,67</sup> La producción de microalgas generalmente se lleva a cabo en estanques cercanos a lagos de alta salinidad. En Rusia y en Australia se han explotado sistemas naturales, mientras que en Israel y en los Estados Unidos se emplean sistemas de cultivo controlados de alta densidad celular. Los sistemas de cultivo más grandes tienen capacidades de 10 millones de litros. Cuando el alga se cultiva en un medio con bajo contenido de nitrógeno, alta salinidad y alta luminosidad, el contenido de β-caroteno puede llegar hasta 14% del peso seco.<sup>10,19,31,50</sup> En la compañía Cianotech, Inc. de Woodinville, Washington, se produce Kanotene, obtenido de células secas y pulverizadas de *D. salina*, alternativamente la compañía Microbio Resources Inc. de San Diego California, produce β-caroteno extraído de esta microalga.<sup>10,50</sup>

El caroteno derivado de las microalgas tiene un costo de producción superior al sintético, sin embargo, ha encontrado un nicho en el mercado de productos naturales.<sup>19</sup> En Rusia, desde los años sesentas se produce β-caroteno por medio del único proceso que emplea hongos para este fin.<sup>19,67</sup> Los productos son: β-caroteno puro y micelio del hongo *Blakeslea trispora* con un alto contenido de β-caroteno. La concentración de β-caroteno obtenida es de 3 g/L en un medio que contiene pasta de soya, maíz, vitamina B1, aceite de girasol y β-ionona.

La astaxantina es otro carotenoide cuya producción comercial a partir de algas y levaduras está siendo seriamente considerada. Microbio Resources Inc. ha desarrollado un proceso que emplea el alga *Haematococcus pluvialis*, en el que la producción se lleva a cabo en estanques de 4500 m<sup>3</sup> de capacidad. El producto se comercializa con el nombre de Algaxan Red a un precio de USA \$20 por Kg, que con un contenido de astaxantina del 1% compite favorablemente con la astaxantina sintética.<sup>31</sup> Por otra parte, las cepas silvestres de la levadura *P. rhodozyma* producen astaxantina a concentraciones menores de 500 µg/g.<sup>30</sup> Para hacer redituable la producción industrial fue necesario obtener mutantes con un contenido mínimo de 3000 µg/g.<sup>31</sup> En esta década varias compañías como Phillips Petroleum, Ingene, Universal Foods y Gist Brocades han iniciado la comercialización de esta levadura.

## PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDEOS SINTÉTICOS

De los más de 600 carotenoideos identificados hasta ahora, cerca de 200 se habían sintetizado hasta 1994, incluyendo estructuras tan complejas como la de la peridinina, que fue sintetizada en forma ópticamente activa en 1990.<sup>14,54</sup> Sólo alrededor de 40 carotenoideos son consumi-

dos regularmente por el ser humano y unos cuantos se producen industrialmente.<sup>31,51</sup> La primera síntesis química de β-caroteno fue realizada por Karrer y Eugster en 1950. El principio de construcción que se usó, todavía se utiliza actualmente para la síntesis industrial de carotenoideos y consiste en acoplar grupos terminales a un fragmento central.<sup>14,51,54</sup> En condiciones controladas, es posible acoplar dos grupos terminales para producir un carotenoide completo o bien acoplar un solo grupo terminal para producir un apocarotenoide. Este mismo esquema se puede usar para sintetizar carotenoideos asimétricos por medio de la adición sucesiva de dos grupos terminales diferentes. Los dos mayores productores de carotenoideos sintéticos son Roche (Suiza) y BASF AG (Alemania) que producen 6 diferentes carotenoideos: β-caroteno, cantaxantina, astaxantina, β-apo-8-carotenal (C<sub>30</sub>), éster etílico del ácido β-apo-8-carotenico (C<sub>30</sub>) y citranaxantina (C<sub>33</sub>).<sup>14,31,51,54</sup> Para unir los grupos terminales al fragmento central, Roche emplea la reacción de Grignard y la condensación enol-éter, mientras BASF AG emplea las reacciones de Wittig y la etinilación.<sup>14,51</sup>

La primera síntesis industrial fue realizada por Roche en 1954, con el esquema C<sub>19</sub> + C<sub>2</sub> + C<sub>19</sub> (Fig. 8).<sup>14,51,54</sup> La condensación enol-éter (Fig. 9) es un método muy eficiente para la síntesis del aldehído C<sub>19</sub>, ésta condensación permite

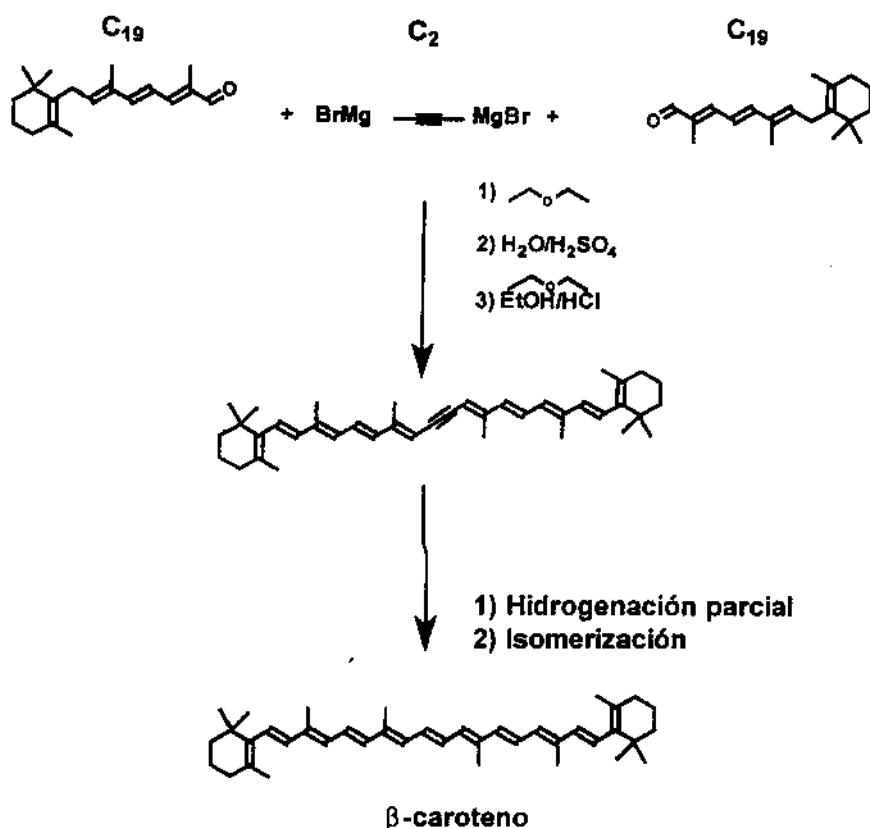
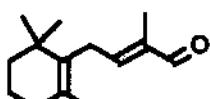


Figura 8. La reacción de Grignard, esquema para la síntesis de β-caroteno.

1)  $\text{HC}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$  en EtOH

**C<sub>13</sub>**
**β-ionona**


## 3) HOAc/NaOAc

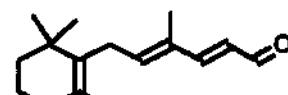

**C<sub>15</sub>**

Figura 9. Condensación enol-éter: para alargar la cadena carbonada de intermediarios de la producción de β-caroteno. Acido acético (HOAc); acetato de sodio (NaOAc).

alargar la cadena carbonada de aldehídos conjugados en 2 carbonos cada vez, de manera que a partir de β-ionona, en varias etapas de reacción, se obtiene C<sub>19</sub>. La β-ionona a su vez es obtenida a partir de moléculas sencillas como acetona y acetileno o alternativamente a partir de isobuteno y formaldehído. El proceso completo es complejo, requiere en total de más de 20 etapas de reacción, sin embargo, Roche lo ha usado exitosamente durante más de 40 años.<sup>51</sup> Los apo-β-carotenos se preparan también a partir del aldehído C<sub>19</sub>. Sin embargo, como la cadena poliénica ramificada 1,6 no puede sintetizarse por la condensación enol-éter, en este caso es necesario preparar un acetal C<sub>6</sub> para alargar parcialmente la cadena de C<sub>19</sub>. Después se usa la reacción

de Grignard y la condensación enol-éter para completar la molécula. Por otra parte, para la síntesis de carotenoides la compañía BASF AG emplea la reacción entre un aldehído y una sal de fosfonio, conocida como la reacción de Wittig. En la actualidad esta reacción es por mucho la más importante en la síntesis comercial, debido a que permite la formación de dobles enlaces de carbono en sitios específicos de la molécula. BASF AG ha desarrollado dos estrategias fundamentalmente diferentes para la síntesis.<sup>14,51,54</sup> La primera, se lleva a cabo a partir de la vitamina A, cuya cadena isoprénica puede alargarse para producir apocarotenos o por condensación de dos moléculas, una en forma de sal de fosfonio y la otra en forma de retinal, para producir el

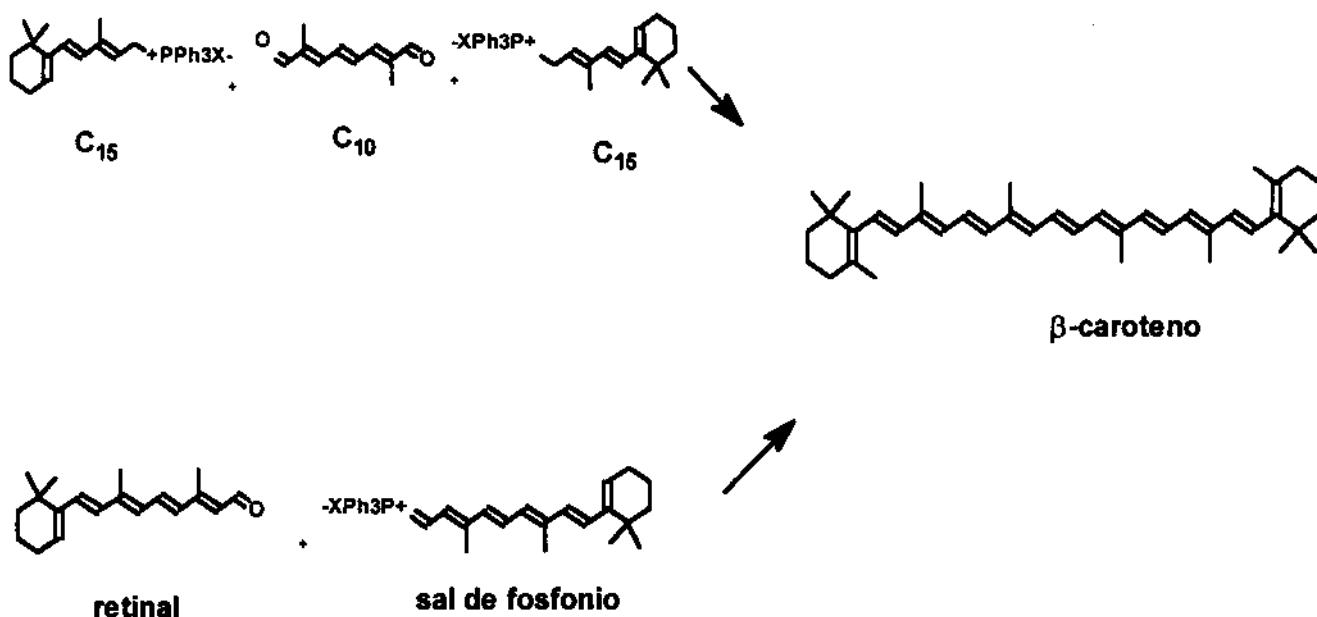


Figura 10. Síntesis química de β-caroteno mediante la reacción de Wittig.

$\beta$ -caroteno (Fig. 10). La segunda estrategia, se basa en el principio de acoplar grupos terminales a un bloque central. La olefinación de Wittig fue usada por primera vez a escala industrial por BASF AG para producir acetato de vitamina A y después para producir otros carotenoides siguiendo el esquema  $C_{15} + C_{10} + C_{15} = C_{40}$ .<sup>51</sup>

Como se mencionó antes, xantofilas como la cantaxantina y la astaxantina pueden producirse por oxidación del  $\beta$ -caroteno. El proceso desarrollado por Roche en los años sesentas para cantaxantina, consiste en oxidar al  $\beta$ -caroteno a isozeaxantina con NBS en ácido acético/cloroformo, la cual por deshidrogenación produce la cantaxantina. En el procedimiento de BASF AG, la oxidación se lleva a cabo en un sistema bifásico de diclorometano/agua que usa como oxidante al clorato de sodio en presencia de trazas de yoduro de sodio como catalizador.<sup>51</sup> De manera similar, la astaxantina puede obtenerse a partir de cantaxantina por oxidación con 1-fenilsulfonil-2-feniloxaziridina previa formación del bisenolato. La desventaja de estas oxidaciones es que generalmente producen mezclas de isómeros y reacciones secundarias, lo que conduce a una complicada purificación. Por ello es preferible sintetizar los grupos terminales con los grupos oxigenados incluidos y después por la reacción de Wittig, sintetizar el carotenoido siguiendo el esquema  $C_{15} + C_{10} + C_{15} = C_{40}$ .

Esta estrategia desarrollada por Roche en los años setentas, es actualmente la vía de síntesis preferida comercialmente.

Los grupos terminales para la síntesis de  $\beta$ -caroteno y las xantofilas: astaxantina, cantaxantina, zeaxantina, rodaxantina y capsorubina, se obtienen de la 6-oxoisoforona mediante reacciones sencillas de oxidación y reducción (Fig. 11). Roche desde 1984, produce comercialmente astaxantina de esta forma.<sup>51</sup>

Los carotenoides sintéticos se producen en forma de cristales grandes (20 a 30  $\mu\text{m}$ ), estables por largo tiempo en ausencia de luz y oxígeno. Por esto, la reducción de tamaño de los cristales primarios, a menos de 1  $\mu\text{m}$ , y la adición de antioxidantes y emulsificantes son operaciones comunes en muchas formulaciones.<sup>14,51</sup> Por ejemplo, una dispersión microcristalina del carotenoido en grasa comestible se usa para la fabricación de mantequillas y margarina. Para usarse en medios acuosos como jugos de frutas, se usan preparaciones en polvo en las que el carotenoido se microdispersa en un coloide protector hidrofílico. Las ventas de astaxantina y  $\beta$ -caroteno principalmente, han aumentado considerablemente a partir de 1990. El carotenoido de mayor venta es el  $\beta$ -caroteno con una producción anual estimada de 500 toneladas.<sup>14</sup> Los carotenoides se comercializan a precios por kilo del orden de USA \$600 para el  $\beta$ -caroteno y para los  $\beta$ -apo-8-carotenoides, de USA \$1300.

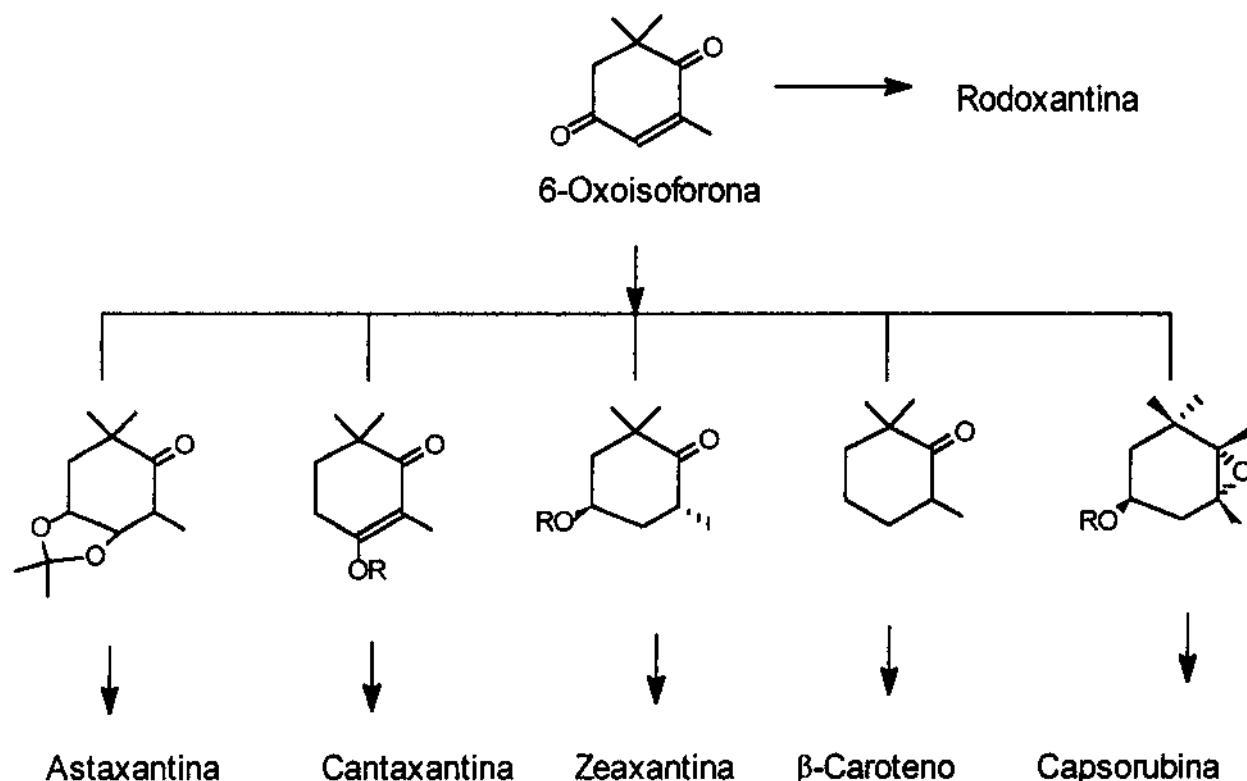


Figura 11. Grupos terminales empleados para la síntesis de  $\beta$ -caroteno y diferentes xantofilas.



para la cantaxantina y USA \$2500 para la astaxantina.<sup>14</sup> En 1995 las ventas de carotenoides sintéticos fueron cercanas a los 500 millones de dólares.<sup>51</sup> Otros carotenoides con potencial económico para los que se han desarrollado vías de síntesis industrial son el licopeno, zeaxantina y capsorubina.

## APLICACIONES DE LOS CAROTENOIDEOS

Los carotenoides se han usado tradicionalmente como aditivos en algunos alimentos, bebidas y forrajes, ya sea en forma de extractos naturales o como compuestos puros. Los colorantes más usados en alimentos, fármacos y cosméticos incluyen a  $\beta$ -caroteno, cantaxantina, luteína, astaxantina, zeaxantina, capsantina, capsorubina, rodoxantina y algunos apocarotenoides.<sup>31,37,49</sup> En la avicultura se han utilizado durante muchos años, extractos naturales de zeaxantina, luteína y cantaxantina, básicamente en la alimentación de gallinas de postura y pollos de engorda para optimizar el color de la yema de huevo y la piel de pollo.<sup>20,42</sup>

En acuacultura se usa astaxantina para pigmentar la carne, piel o exoesqueleto de salmones y crustáceos.<sup>49,63,65</sup> Otros carotenoides como el  $\beta$ -caroteno y el 8-apocarotenal se utilizan en la producción de quesos, mantequilla, jugos, helados y dulces entre otros.

Está bien demostrado que la ingesta de carotenoides es un factor importante en la salud humana. Algunos de ellos pueden transformarse en vitamina A, además ejercen protección contra serias enfermedades degenerativas y recientemente se ha descubierto que estimulan la respuesta inmune. Algunos carotenoides como el  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y criptoxantina son una importante fuente de vitamina A en mamíferos. En humanos, la deficiencia dietética de vitamina A es un problema que afecta a nivel mundial, especialmente a los niños, por lo que se ha buscado suplementar alimentos con carotenoides, particularmente con  $\beta$ -caroteno.<sup>64</sup> King y col., (1995)<sup>36</sup> probaron que el  $\beta$ -caroteno lograba incrementar el contenido de acetato de vitamina A en la carne de pollos alimentados durante tres semanas con este carotenoide. En los últimos 10 años, las propiedades antioxidantes de los carotenoides han despertado un interés creciente. Yin y Cheng, (1997),<sup>68</sup> han demostrado el poder antioxidante del  $\beta$ -caroteno, empleando un modelo de liposomas. Por otro lado, dentro del área de la medicina los carotenoides están recibiendo considerable atención debido a que su capacidad antioxidante se ha relacionado con la prevención del desarrollo de enfermedades como el cáncer, arteriosclerosis, cataratas, degeneración macular, envejecimiento prematuro y otras enfermedades degenerativas. Adicionalmente existen datos que indican que los carotenoides incrementan la respuesta inmune.<sup>60</sup> El  $\beta$ -caroteno y la cantaxantina han sido utilizados durante muchos años para el tratamiento de enfermedades por fotosensibilidad. La gran mayoría de los pacientes con protoporfiria eritropoética se han beneficiado de tratamientos

con dosis altas de  $\beta$ -caroteno sin tener efectos secundarios, pero dosis altas de cantaxantina, en algunos casos han causado problemas visuales debido a su precipitación en la retina.<sup>43</sup>

En los últimos años, diversos estudios epidemiológicos han demostrado una relación inversa entre el consumo de frutas y verduras ricas en carotenoides y el riesgo de desarrollar cáncer en varios tejidos.<sup>9,23,52</sup> Es decir, los individuos con mayores niveles de carotenoides en suero y tejidos han presentado un menor riesgo de cáncer. Desgraciadamente, los resultados de estudios en los que se suplementó la dieta con  $\beta$ -caroteno sintético sólo o en combinación con otros antioxidantes como vitamina C, E o retinol, han mostrado resultados mixtos. Por ejemplo, existen datos que muestran una reducción de lesiones pre-cancerígenas en cervix y en cavidad oral, en respuesta a tratamiento con  $\beta$ -caroteno, pero no se observó reducción de lesiones en pulmón.<sup>44</sup> Asimismo, hay discrepancia entre los efectos de la suplementación con diferentes dosis de  $\beta$ -caroteno o su aplicación en poblaciones diferentes, con la misma enfermedad. La ausencia de un efecto protector del  $\beta$ -caroteno en varias enfermedades podría tener varias causas: 1) Los carotenoides no actúan directamente como agente protector, sino que los niveles de carotenoides en sangre o tejidos sirven como marcadores de otros factores de protección. 2) se ha sugerido que el  $\beta$ -caroteno podría actuar en combinación con otros carotenoides o fitoquímicos presentes en los alimentos 3) El  $\beta$ -caroteno en dosis altas, podría inhibir la absorción intestinal de otros nutrientes importantes para un efecto anticancerígeno. 4) Diferentes antioxidantes se han encontrado preferencialmente en diferentes tejidos, por ello es probable que cada carotenoide funcione selectivamente.<sup>44,47</sup>

Al igual que los estudios con cáncer, los estudios epidemiológicos sugieren que la oxidación de lipoproteínas juega un papel importante en el desarrollo de arteriosclerosis y que niveles altos de antioxidantes en el plasma pueden ayudar a prevenir esta enfermedad al inhibir la peroxidación lipídica.<sup>38</sup> Por ello, una dieta rica en carotenoides o de otros antioxidantes como vitaminas C y E, puede ayudar a prevenir enfermedades cardiovasculares.<sup>22,23</sup> También en este caso los estudios en los que se usó  $\beta$ -caroteno sintético han mostrado poco efecto protector contra la arteriosclerosis. Sin embargo, los extractos de licopeno natural derivados del jitomate muestran un efecto hipocolesterolémico significativo a nivel celular, inhibiendo la síntesis intracelular de colesterol en macrófagos y a nivel sistémico en humanos.<sup>21</sup> También se ha encontrado que en macrófagos, el licopeno se absorbe más fácilmente que el  $\beta$ -caroteno, sugiriendo una absorción diferencial de diversos carotenoides en varios tejidos celulares. Se ha encontrado que los carotenoides pueden actuar como agentes protectores en la degeneración macular y reducir el desarrollo de cataratas. Se piensa que las cataratas resultan de la fotooxidación y precipitación de las proteínas del cristalino. En cuanto a la degeneración macular, la luz visible azul puede llegar a la

retina y podría contribuir al daño fótico de la misma.<sup>62</sup> Varios estudios han reportado una asociación entre la alimentación alta en carotenoides, en especial luteína y zeaxantina, y la reducción en el riesgo de éstas enfermedades.

Todavía hay mucho que descubrir sobre los efectos de los carotenoides en el cuerpo humano y los efectos protectores de los mismos contra varias enfermedades. Algunas agencias gubernamentales en Estados Unidos han recomendado una ingesta diaria de 6 mg de  $\beta$ -caroteno para adultos y de 10-30 mg para ancianos para mantener una salud óptima. Sin embargo, basado en los datos que se tienen, el aumentar los alimentos con carotenoides naturales, en vez consumir carotenoides sintéticos podría ser de mayor beneficio para la prevención de enfermedades.

## REFERENCIAS

1. Alcántara, S. y S. Sánchez. 1999. Influence of carbon and nitrogen sources on *Flavobacterium* growth and zeaxanthin biosynthesis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (Aceptado para publicación).
2. An, G. H., D. B. Schuman y E. A. Johnson. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:116-124.
3. Armstrong, G. A. 1997. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: A colorful tale. *Ann. Rev. Microbiol.* 51:629-659.
4. Armstrong, G. A. y J. E. Hearst. 1996. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* 10:228-237.
5. Armstrong, G.A. 1994. Eubacteria show their true colors: Genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* 176:4795-4802.
6. Bach, T. J. 1995. Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants a review. *Lipids* 30:191-202.
7. Becker-Hapak, M., E. Troxtel, J. Hoerter y A. Eisenstark. 1997. *RpoS* dependent overexpression of carotenoids from *Erwinia herbicola* in OXYR deficient *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 239:305-309.
8. Bejarano, E. R., F. Parra, F. J. Murillo y E. Cerdá-Olmedo. 1988. End-product regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Arch. Microbiol.* 150:209-214.
9. Block, G., B. Patterson y A. Subar. 1992. Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer* 18:1-20.
10. Borowitzka, L. J. y M. A. Borowitzka. 1989.  $\beta$ -carotene (provitamin A) production with algae. En E. J. Vandamme (ed). *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors*, p. 15-26. Elsevier Applied Science, London.
11. Bramley, P. M. y A. Mackenzie. 1988. Regulation of carotenoid biosynthesis. *Curr. Top. Cellular Reg.* 29:291-343.
12. Britton, G. 1991. Carotenoids. *Meth. Plant Biochem.* 7: 473-517.
13. Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9: 551-1558.
14. Britton, G., S. Liaaen-Jensen y H. Pfander. 1995. Carotenoids today and challenges for the future. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids Vol. 1A : Isolation and Analysis*, p. 13-26. Birkhäuser Verlag, Basel.
15. Cerdá-Olmedo, E. 1985. Carotene mutants of *Phycomyces*. *Methods Enzymol.* 110:220-243.
16. Di Mascio, P., T. P. A. Devaasagayam, S. Kaiser y H. Sies. 1990. Carotenoid, tocopherols and thiols as biological singlet molecular quenchers. *Biochem. Soc. Trans.* 18:1054-1056.
17. Disch, A., J. Schwender, C. Müller, H. K. Lichtenthaler y M. Rohmer. 1998. Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *Biochem. J.* 333:381-388.
18. Eugster, C. H. 1995. History: 175 years of carotenoid chemistry. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (ed). *Carotenoids Vol. 1A: Isolation and Analysis* p. 1-11. Birkhäuser Verlag, Basel.
19. Fefilova, E. P. 1994. Fungal carotenoids: their biological functions and practical use (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 30:143-153.
20. Fletcher, D. L. 1992. Methodology for achieving pigment specifications. *Poultry Sci.* 71:773-743.
21. Fuhrman, B., A. Elis y M. Aviram. 1997. Hypocholesterolemic effect of lycopene and  $\beta$ -carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 233:658-662.
22. Gaziano, J. M. 1994. Antioxidant vitamins and coronary artery disease risk. *Am. J. Med.* 97:(suppl. 3A) 18s-21s.
23. Gey, K. F. 1998. Vitamins E plus C and interacting nutrients required for optimal health. A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer. *Biofactors* 7:113-174.
24. Giuliano, G., D. Pollock, H. Stapp y P. A. Scolnik. 1988. A genetic-physical map of the *Rhodobacter capsulatus* carotenoid biosynthesis gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* 213:78-83.
25. Goodwin, T. W. 1993. Biosynthesis of carotenoids: An overview. *Methods Enzymol.* 214:330-340.
26. Hampton, R., D. Dimster-Denk y J. Rine. 1996. The biology of HMG-CoA reductase: the pros of counter-regulation. *TIBS* 21:140-145.
27. Houssaini-Iraqi, M., R. Lazraq, S. Clavel-Seres, N. Rastogi y H. L. David. 1992. Cloning and expression of *Mycobacterium aurum* carotenogenesis genes in



- Mycobacterium smegmatis*. FEMS Microbiol. Letters 90:239-244.
28. Hunter, C. N., B. S. Hundle, J. E. Hearst, H. P. Lang, A. T. Gardiner, S. Takaichi y R. J. Cogdell. 1994. Introduction of new carotenoids into the bacterial photosynthetic apparatus by combining the carotenoid biosynthetic pathways of *Erwinia herbicola* and *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 176:3692-3697.
29. Jefcoate, C. R. 1986. Cytochrome P-450 enzymes in sterol biosynthesis and metabolism. En: O. De Monte-llano (ed.). *Cytochrome P-450, Structure, Mechanism and Biochemistry*, p. 387-428. Plenum Publishing Corp., New York.
30. Johnson, E. A. y M. J. Lewis. 1979. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 115:173-183.
31. Johnson, E. A. y W. A. Schroeder. 1995. Microbial carotenoids. *Adv. Biochem. Eng.* 53:119-178.
32. Johnson, E. A. y W. A. Schroeder. 1996. Biotechnology of astaxanthin production in *Phaffia rhodozyma*, En: G.R. Takeoka, R. Teranishi, P. J. Williams y A. Kobayashi (ed). *Biotechnology for Improved Foods and Flavors*, p. 39-50. Symposium series 637, American Chemical Society, Washington, D.C.
33. Kajiwara, S., P. D. Fraser, K. Kondo y N. Misawa. 1997. Expression of exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 324:421-426.
34. Karnauknov, V. N. 1990. Carotenoids: Recent progress, problems and prospects. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B:1-20.
35. Khan, A. U. y M. Kasha. 1994. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12365-12367.
36. King, A. J., T. G. Uijttenboogaart y A.W. De Vries. 1995.  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -carotene and ascorbic acid as antioxidants in stored poultry muscle. *J. Food Sci.* 60:1009-1012.
37. Klaui, H. y J. C. Bauernfeind. 1981. Carotenoids as food color. En: J. C. Bauernfend (ed). *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors* p. 48-319. Academic Press, New York.
38. Kostner, K., S. Hornykewycz, P. Yang, T. Neunteufel, D. Glugar, F. Weidinger, G. Maurer y K. Huber. 1997. Is oxidative stress causally linked to unstable angina pectoris? A study in 100 CAD patients and matched controls. *Cardiovasc. Res.* 36:330-336.
39. Lichtenhaler, H. K., J. Schwender, A. Disch y M. Rohmer. 1997. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Letters* 40:271-274.
40. Martínez-Laborda, A., M. Elias, R. Ruiz-Vásquez y F. J. Murillo. 1986. Insertion of Tn5 linked to mutations affecting carotenoid synthesis in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Gen. Genet.* 205:107-114.
41. Martínez-Laborda, A. J., J. M. Balsalobre, M. Fontes y F. J. Murillo. 1990. Accumulation of carotenoids in structural and regulatory mutants of the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol. Gen. Genet.* 223:205-210.
42. Marusich, W. L. y J. C. Bauernfeind. 1981. Oxycarotenoids in poultry feeds. En: J. C. Bauernfeind (ed) *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*. p. 319-462. Academic Press, New York y Londres.
43. Mathews-Roth, M. M. 1993. Carotenoids in erythropoietic protoporphyrin and other photosensitivity diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 691:148-155.
44. Mayne, S. T. 1996. Beta-carotene, carotenoids and disease prevention in humans. *FASEB J.* 10: 690-701.
45. Misawa, N., M. Nakagawa, K. Kobayashi, S. Yamano, Y. Izawa, K. Nakamura y K. Harashima. 1990. Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172: 6704-6712.
46. Misawa, N., S. Yamano y H. Ikenaga. 1991. Production of beta-carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by introduction of the biosynthetic genes from *Erwinia uredovora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1847-1849.
47. Mobarhan, S., A. Shiao, A. Grande, S. K. Stacewicz-Sapuntzakis, T. Oldham, Y. Liao, P. Bowen, M. Dyavanapalli, N. Kazi, K. McNeal y T. Frommel. 1994.  $\beta$ -carotene supplementation results in an increased serum and colonic mucosal concentration of  $\beta$ -carotene and a decrease in alpha-tocopherol concentration in patients with colonic neoplasia. *Cancer Epidemiol. Biomarkers and Prev.* 3:501-505.
48. Murillo, F. J., I. L. Calderón, I. López Díaz y E. Cerdá-Olmedo. 1978. Carotene-superproducing strains of *Phycomyces*. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:639-642.
49. Nelis, J. H. y A. P. De Leenheer. 1991. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *J. Appl. Bacteriol.* 70:181-191.
50. Nonomura, A. M. 1990. Industrial biosynthesis of carotenoids. En: N. I. Krinsky  $\alpha\text{v}\delta$  col. (eds.). *Carotenoids: Chemistry and Biology*, p.365-375. Plenum Press, New York.
51. Paust, J. 1996. Carotenoids technical synthesis. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen  $\alpha\text{v}\delta$  H. Pfander (eds.). *Carotenoids Vol. 2: Synthesis*, p. 259-291. Birkhäuser Verlang, Basel.
52. Peng, Y. M., Y. S. Peng, J. M. Childers, K. D. Hatch, D. J. Roe, Y. Lin y P. Lina. 1998. Concentrations of carotenoids, tocopherols, and retinol in paired plasma and cervical tissue of patients with cervical cancer, pre-cancer, and noncancerous diseases. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 7:347-350.
53. Perry, K. L., A. Simonitch, K. J. Harrison-Lavoie y S. Liu. 1986. Cloning and regulation of *Erwinia herbicola* pigment genes. *J. Bacteriol.* 168:607-612.
54. Pfander, H., S. Liaaen-Jensen y G. Britton. 1996. Synthesis in perspective. En: G. Britton, S. Liaaen-Jensen

- y H. Pfander (eds.). *Carotenoids Vol. 2: Synthesis*, p. 1-6. Birkhäuser Verlang, Basel.
55. Rohmer, M., M. Knani, P. Simonin, B. Sutter y H. Sahm. 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps winding to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* 295:517-524.
56. Sandmann, G. 1994. Carotenoids biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur. J. Biochem.* 223:7-24.
57. Sandmann, G., W. S. Woods y R. W. Tuveson. 1990. Identification of carotenoids in *Erwinia herbicola* and in a transformed *Escherichia coli* strain. *FEMS Microbiol.* 71:77-82.
58. Schewender, J., M. Seemann, H. K. Lichtenthaler y M. Rohmer. 1996. Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem. J.* 316:73-80.
59. Schiedt, K. y S. Liaaen-Jensen. 1995. Isolation and analysis. En: G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids Vol. 1A: Isolation and Analysis*, p. 81-103. Birkhäuser Verlang, Basel.
60. Schmidt, K. 1997. Interaction of antioxidative micronutrients with host defense mechanisms. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 67:307-311.
61. Schroeder, W. A. y E. A. Johnson. 1995. Singlet oxygen and peroxil radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J. Biol. Chem.* 270:18374-18379.
62. Seddon, J. M., U. A. Ajani, R. D. Sperduto, R. Hiller, N. Blair, T. Burton, M. D. Farber, E. S. Gragoudos, J. Haller, D. T. Miller, L. A. Yannuzzi y W. Willett. 1994. Dietary carotenoids, vitamins A, C and E, and advanced age-related macular degeneration. *J. Am. Med. Assn.* 272:1413-1420.
63. Shahaidi, F., Metusalach y J. A. Brown. 1998. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38:1-67.
64. Simonne, A. H., N. R. Green y D. I. Bransby. 1996. Consumer acceptability and  $\beta$ -carotene content of beef as related to cattle finishing diets. *J. Food Sci.* 61: 1254-1256.
65. Simpson, K. L., T. Katayama y C. O. Chichester. 1981. Carotenoids in fish feeds. En: J.C. BAUERNFEND (ed.) *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*, p. 463-538. Academic Press, New York.
66. Stadtman, E. R. 1992. Protein oxidation and aging. *Science* 257:1220-1224.
67. Vandamme, E. J. 1992. Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 53:313-327.
68. Ying, M. C. y W. S. Cheng. 1997. Oxymyoglobin and lipid oxidation in phosphatidylcholine liposomes retarded by  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene. *J. Food Sci.* 62:1095-1097.