

B. Alimentación y Nutrición I, II, III

**CLONACIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN
FUNCIONAL DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA
BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS
POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA EN
*Namalycastis rhodochorde***

**Khalida Bainour¹, Nabilah Farahin², Ka-Kei Sam², Francisco Hontoria¹,
Juan C. Navarro¹, Alexander Chong Shu-Chien², Óscar Monroig¹**

¹Instituto de Acuicultura Torre de la Sal (IATS), CSIC, 12595 Ribera de Cabanes,
Castellón, España

²Center for Chemical Biology, Universiti Sains Malaysia, Persiaran Bukit Jambul, 11900
Bayan Lepas, Penang, Malasia

Resumen

La demanda creciente de materias primas tradicionales como las harinas y los aceites de pescado han impulsado la búsqueda de alternativas sostenibles ricas en nutrientes esenciales como los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ("LC-PUFAs" del inglés). Los ingredientes producidos a partir de invertebrados acuáticos como los poliquetos han suscitado interés debido a su alto contenido de LC-PUFAs, en parte explicado por procesos de producción endógena (biosíntesis). El objetivo de este estudio ha sido determinar la capacidad biosintética de LC-PUFAs en el poliqueto *Namalycastis rhodochorde*, una especie adaptada a agua dulce a la que se le presupone una mayor capacidad de biosíntesis de LC-PUFAs dado que ha de compensar la limitada disponibilidad de estos nutrientes esenciales en su entorno. Los resultados muestran que *N. rhodochorde* posee tres enzimas elongasas (Elov12/5, Elov14 y Elov11/7), dos desaturasas "front-end" (Fed1 y Fed2) y dos desaturasas "methyl-end" ($\Delta 12$ y $\omega 3$), cuyas actividades permiten a estos poliquetos producir LC-PUFAs de manera autónoma. Estos hallazgos demuestran el gran potencial que los poliquetos de agua dulce ofrecen para la producción de nuevas fuentes ricas en LC-PUFAs para su uso en acuicultura, a partir de su cultivo intensivo en condiciones que potencien las rutas de biosíntesis.

Introducción

El uso de ingredientes marinos (harinas y aceites de pescado) en piensos de acuicultura garantiza un óptimo crecimiento y desarrollo de los peces cultivados al satisfacer sus requerimientos en nutrientes esenciales, incluyendo los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ($\geq C_{20}$) ("LC-PUFAs" en inglés) como los ácidos eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) y araquidónico (ARA, 20:4n-6). No obstante, la disponibilidad limitada y el alto coste de estos ingredientes han impulsado la búsqueda de alternativas más sostenibles. Así, los productos derivados de invertebrados acuáticos, como los poliquetos, se postulan como ingredientes alternativos ricos en LC-PUFAs con gran potencial. Recientes investigaciones centradas en especies de poliquetos marinos han demostrado que estos invertebrados poseen un conjunto completo de enzimas que les permiten sintetizar LC-PUFAs *de novo*, entre las que destacan las elongasas (Elov1), las desaturasas "front-end" (Fed) y las desaturasas "methyl-end" (ω -des) (Monroig *et al.*, 2022). Esta capacidad metabólica, unida a la gran diversidad biológica de los poliquetos, permite explorar la hipótesis basada en que las especies adaptadas a agua dulce tienen una mayor capacidad de biosíntesis de LC-PUFAs como mecanismo para compensar la limitada disponibilidad de estos nutrientes esenciales a través de la dieta. El objetivo de esta investigación es estudiar la biosíntesis de LC-PUFAs en el poliqueto nereido *Namalycastis rhodochorde*, una especie que se encuentra habitualmente en agua dulce y muy apreciada como cebo. Para ello, se ha llevado a cabo la caracterización molecular y funcional de las enzimas Elov1, Fed y ω -des involucradas en las rutas biosintéticas de LC-PUFAs en *N. rhodochorde*.

Material y métodos

Para la caracterización molecular, se realizaron búsquedas sistemáticas en bases de datos transcriptómicas específicas de *N. rhodochorde* con el fin de identificar las secuencias completas de elongasas y desaturasas homólogas a las previamente caracterizadas en otros poliquetos marinos. Se identificaron los motivos conservados, así como las relaciones filogenéticas de las enzimas codificadas con las de otros organismos. La caracterización funcional de las elongasas y desaturasas implicadas en la biosíntesis de LC-PUFAs de

N. rhodochorde se realizó en un sistema de expresión heteróloga basado en levaduras. Brevemente, las regiones codificantes de los genes de elongasas y desaturasas se amplificaron mediante PCR usando cDNA de *N. rhodochorde* como molde, y cebadores con sitios específicos de restricción para su posterior clonación en el vector de expresión de levaduras pYES2. Las levaduras transgénicas transformadas con las elongasas y desaturasas de *N. rhodochorde* se incubaron en presencia de una serie de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) suplementados exógenamente, para determinar su capacidad de elongación y desaturación, respectivamente. Tras 48 h, se recogían las muestras de levaduras para analizar posteriormente los perfiles de ácidos grasos mediante cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS). Las conversiones realizadas por los enzimas estudiados fueron calculadas según la fórmula $[\text{área del producto} / (\text{área del producto} + \text{área del sustrato})] \times 100$.

Resultados y discusión

N. rhodochorde tiene tres Elov1, dos Fed y dos ω -des con funciones en las rutas de biosíntesis de LC-PUFAs. Las elongasas, identificadas como Elov12/5, Elov14 y Elov11/7 a partir de su homología con enzimas Elov1 de vertebrados (Monroig *et al.*, 2022), tienen la capacidad de alargar sustratos PUFAs desde C₁₈ hasta C₂₂. Es de destacar que la Elov14 de *N. rhodochorde* puede elongar sustratos de C₂₂ para generar productos de hasta 26 carbonos de longitud, característica similar a la observada en Elov14 de otros invertebrados (Ribes Navarro *et al.*, 2021). Además, *N. rhodochorde* posee dos desaturasas "front-end" cuyos ensayos funcionales mostraron una actividad $\Delta 5$ desaturasa para Fed1 y dual $\Delta 6/\Delta 8$ para Fed2. Concretamente, Fed1 es una $\Delta 5$ desaturasa que permite la síntesis de ARA y EPA a partir de sus precursores 20:3n-6 y 20:4n-3, respectivamente. La actividad $\Delta 6$ desaturasa de Fed2 permite convertir el ácido linoleico (18:2n-6) y el ácido α -linolénico (18:3n-3) en 18:3n-6 y 18:4n-3, respectivamente; además, la Fed2 mostró tener actividad $\Delta 8$ sobre 20:2n-6 y 20:3n-3, convirtiéndolos en 20:3n-6 y 20:4n-3, respectivamente. Estos resultados sugieren que *N. rhodochorde* tiene una limitada capacidad para la biosíntesis de DHA debido, entre otras consideraciones, a la ausencia de una Fed con actividad $\Delta 4$ desaturasa. La característica distintiva de las rutas de síntesis de LC-PUFAs en esta especie radica en la presencia de desaturasas ω -des, que incluyen una desaturasa $\Delta 12$ que permite la producción del LA (síntesis *de novo* de PUFAs) y una desaturasa $\omega 3$, con capacidad para convertir varios $\omega 6$ LC-PUFAs en los correspondientes productos $\omega 3$ LC-PUFAs. Estos hallazgos sugieren que *N. rhodochorde* posee las enzimas necesarias para producir *de novo* LC-PUFAs de alto valor nutricional, como ARA y EPA. Esta capacidad plantea la posibilidad de cultivar estos poliquetos utilizando sustratos nutricionalmente pobres para crear una nueva fuente alternativa y sostenible de ingredientes ricos en LC-PUFAs.

Palabras clave

Desaturasas, elongasas, LC-PUFAs, *Namalycastis rhodochorde*

Bibliografía

Monroig, Ó., Shu-Chien, A.C., Kabeya, N., Tocher, D., Castro, F., 2022. Desaturases and elongases involved in long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic animals: From genes to functions. *Prog. Lipid Res.* 86, 101157.

Ribes-Navarro, A., Navarro, J.C., Hontoria, F., Kabeya, N., Standal, I.B., Evjemo, J.O., Monroig, Ó., 2021. Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in marine gammarids: Molecular cloning and functional characterisation of three fatty acyl elongases. *Marine Drugs.* 19, 226.

Agradecimientos

Esta investigación se enmarca en el proyecto POLYPUFA (PID2022-136234OB-C21) financiado por MICIU/AEI /10.13039/501100011033 y por FEDER, UE. KB está financiada por un contrato predoctoral Santiago Grisolia (GRISOLIA/2021/120) de la Generalitat Valenciana. Además, este estudio forma parte del programa ThinkInAzul con financiación de la Unión Europea NextGenerationEU (PRTR-C17. I1) y de la Generalitat Valenciana (THINKINAZUL/2021/026).

Correo de la Autora

khalida.bainour@csic.es