

# Informe final publicable de proyecto

## Producción de zeaxantina por una cepa antártica de Flavobacterium sp.

Código de proyecto ANII: FMV\_3\_2018\_1\_148809

02/11/2021

**VILA DAVID LIMA, Maria Eugenia** (Responsable Técnico - Científico)

**SARAVIA SILVERA, Maria Veronica** (Investigador)

**VIEITEZ OSORIO, Ignacio Alberto** (Investigador)

**LAREO VARELA, Claudia** (Investigador)

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE INGENIERÍA (Institución Proponente) \\  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA \\  
AGENCIA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN

## Resumen del proyecto

Los microorganismos tienen gran potencial como fuente de pigmentos naturales debido a su alta eficiencia de producción y diversidad de compuestos. Sin embargo, gran parte de los pigmentos del mercado son producidos por síntesis química. En la actualidad se encuentran disponibles en el mercado pigmentos extraídos de microorganismos como: betacaroteno y licopeno de *Blakeslea trispora*, betacaroteno de *Dunaliella salina*, y astaxantina de *Haematococcus pluvialis*. La creciente demanda de los carotenoides se debe al aumento de su utilización como colorantes y como componentes de suplementos alimenticios, debido a exigencias en la reglamentación alimentaria y a crecientes evidencias de su rol biológico beneficioso en la salud. Para que la producción de pigmentos bacterianos sea económicamente viable es necesario mejorar la eficiencia de la fermentación y de la recuperación del producto, pero además hay que considerar su sustentabilidad. Esta propuesta tiene como objetivo la producción de zeaxantina a partir de una cepa antártica de *Flavobacterium sp.* aislada por el grupo de trabajo. El pigmento formado por cepas del género *Flavobacterium* puede contener entre un 95-99% zeaxantina. Se estudiarán la influencia de inductores en el crecimiento y en la producción de zeaxantina, y las mejores condiciones operativas a nivel de fermentador. Se realizará el modelado matemático de las cinéticas de producción de biomasa y carotenoide. Además, se estudiará la extracción de los compuestos con CO<sub>2</sub> supercrítico. Con la información recabada se realizará un estudio técnico-económico de la propuesta.

**Ingeniería y Tecnología / Biotecnología Industrial / Bioproductos, Biomateriales, Bioplásticos, Biocombustibles, Bioderivados, etc. / Pigmentos naturales**

**Palabras clave: Zeaxantina / Flavobacterium sp. / Fluídos supercríticos /**

## Introducción

El mercado mundial de carotenoides posee una tasa de crecimiento sostenido en el entorno al 2%, y proyecciones estiman que alcance los 1700 millones de dólares para el año 2022, según la Global Industry Analysts Inc [1]. La creciente demanda de pigmentos naturales, y la valoración del origen natural del producto, ha llevado a la búsqueda de alternativas que involucren la utilización de microorganismos, con la idea de explotar su potencial en términos de eficiencia en la producción y diversidad de las estructuras [2]. Los carotenoides más demandados son astaxantina, cantaxantina, licopeno, betacaroteno, luteína y zeaxantina [1]. La zeaxantina está compuesta por 40 carbonos, su fórmula química es C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>O<sub>2</sub>, y es una xantofila. Tiene dos centros quirales y por la simetría de la molécula presenta tres estereoisómeros: (3S, 3'S)-zeaxantina, (3R,3'R)-zeaxantina y (3R,3'S)-zeaxantina [3]. Las bacterias sintetizan solo la forma ópticamente activa RR de la zeaxantina. Sin embargo, la síntesis química genera isómeros ópticamente inactivos, y mezclas racémicas. En la actualidad, la principal fuente natural de zeaxantina son los pétalos de *Tagetes erecta* (Marigold). El proceso de extracción implica extracción y saponificación usando tetrahidrofurano e hidróxido de potasio. El producto se obtiene cristalizado, siendo una mezcla de luteína, zeaxantina y zeaxantina dipalmitato [4]. A diferencia del betacaroteno y astaxantina, pocos microorganismos sintetizan zeaxantina. Se han reportado como productoras especies de los siguientes géneros de bacterias: *Mycobacterium*, *Xanthobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Paracoccus*, y *Sphingobacterium* [5]. El pigmento formado por cepas del género *Flavobacterium* puede contener entre un 95-99% de zeaxantina, pudiendo encontrarse en la fase inicial de crecimiento entre un 5-10% de sus precursores: betacaroteno y betacriptoxantina [6]. La literatura científica referente a la producción de zeaxantina por *Flavobacterium* es limitada. Las dos especies de *Flavobacterium* más reportadas son *Flavobacterium sp.* (ATCC 21588) y *Flavobacterium multivorum* (ATCC 55238). La primera, fue aislada en los años 60 por los científicos de Hoffmann - La Roche. Se reportó que es capaz de producir hasta 155 mg/L (con una concentración de 22 mg/g biomasa seca) en un medio con glucosa, caseína, extracto de levadura, sulfato de magnesio y piridoxina [7]. Para *Flavobacterium multivorum* (ATCC 55238) se ha reportado un rendimiento de producción de 11 mg/L en un medio con ácido málico, ácido isocátrico y alfa-ketoglutarato [6]. La obtención de zeaxantina a partir de microorganismos implica dos etapas fundamentales. La primera etapa consiste en el crecimiento celular y producción del pigmento en un medio de cultivo. La segunda, es la extracción de la zeaxantina de la biomasa, ya que es un producto intracelular. La tecnología de extracción con fluidos supercríticos (SCF) ha recibido un notable interés industrial en las últimas

décadas. Sin embargo, su desarrollo y aplicación son aún incipientes. El estudio de este tipo de procesos no tiene antecedentes en nuestro medio. Mediante el desarrollo de estas líneas de investigación, se han realizados aportes muy importantes en un área considerada de punta en el ámbito académico internacional. Los trabajos en la literatura acerca de la extracción de carotenoides con SCF se centran en la extracción a partir de microalgas. Se han reportado en este caso, mejores rendimientos de extracción y mayor selectividad comparada con la extracción con metanol [8]. A nivel industrial, la empresa Algatech, que se especializa en la producción de carotenoides por microalgas utiliza la tecnología de fluidos supercríticos para la extracción de los mismos asegurando productos libres de solventes [9].

El interés en la utilización de zeaxantina como complementación alimentaria en humanos, se debe a que tanto la zeaxantina y la luteína (muy cercana estructuralmente) juegan un rol crítico en la prevención de la ceguera por la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). El National Eye Institute de los Estados Unidos estima que para el 2030 las personas afectadas con AMD serán 3,5 millones de personas en Estados Unidos, y que para el 2050 esta cifra aumente a 5,4 millones. Existe una amplia evidencia epidemiológica de que la cantidad de pigmento macular (zeaxantina y luteína) se asocia inversamente con la incidencia de la AMD, un proceso irreversible que es la principal causa de ceguera en los ancianos. El aumento de la expectativa de vida a nivel mundial, lleva a que a futuro se prevea un mayor impacto de éste tipo de afecciones. Otros estudios epidemiológicos han establecido la relación inversa entre el riesgo de cáncer de próstata y pulmón zeaxantina [10], [11].

A nivel nacional no existe producción de carotenoides. En cuanto a la venta de zeaxantina para ración animal en el mercado uruguayo está Magiar, una empresa que comercializa zeaxantina como aditivo para raciones animales, la cual importa de las empresas Wisdem (China) y Quimtia (representante con presencia en Brasil, Argentina, Colombia y Perú de empresas en cuya gama de productos incluye suplementos con carotenoides). Para consumo humano hay una escasa oferta de productos de laboratorios, los cuales son importados. Sin embargo, a nivel internacional, numerosos laboratorios (DSM, Abbott, etc.) los incluyen en sus formulaciones para suplementos alimenticios.

El Departamento de Bioingeniería se trabaja en la temática desde el año 2014. Se realizó un screening de bacterias antárticas productoras de carotenoides y se seleccionaron cepas con potencial para la producción de carotenoides de interés comercial. La cepa elegida para continuar los estudios produce zeaxantina como carotenoide mayoritario, lo cual fue confirmado en una colaboración con el Instituto de la Grasa (CSIC - España) a través de pruebas químicas y HPLC-MS. La optimización del medio de cultivo que maximice la producción de zeaxantina está siendo aún estudiada, aunque ya se ha logrado duplicar la producción de biomasa y quintuplicar el contenido de la producción de biomasa y carotenoides totales respectivamente. También se han estudiado a nivel de matraces las condiciones operativas de temperatura y agitación que favorecen el proceso. En este proyecto se propone partir del medio optimizado, mejorar la producción por el agregado de inductores, ensayar diferentes modos de operación en reactor de laboratorio, y la integración del proceso de extracción de los carotenoides a través de la tecnología de fluidos supercríticos.

### **Metodología/diseño del estudio**

El presente proyecto formula dos hipótesis principales. La primera es que la cepa seleccionada es una potencial fuente de zeaxantina para su producción biotecnológica. Debido a que los carotenoides juegan un rol protector en las membranas bacterianas [12]-[15], se plantea como hipótesis que una cepa adaptada a condiciones ambientales adversas (bajas temperaturas, altas cargas de radiación UV, etc) como una cepa antártica, podría presentar mayor capacidad de producción de carotenoides, para este caso, particularmente, zeaxantina.

La segunda hipótesis, es que la integración de la tecnología de fluidos supercríticos para la extracción del producto conduce a una propuesta viable desde el punto de vista técnico y económico.

El máximo potencial de producción de la cepa se estudiará optimizando las condiciones de crecimiento microbiano y producción de zeaxantina, a través del estudio de los componentes del medio de cultivo y de las condiciones operativas del biorreactor. Ha sido ampliamente reportado en la literatura científica, que la variación de los componentes del medio de cultivo modifica la producción de carotenoides en los microorganismos, por ejemplo usando distintas fuentes de carbono y nitrógeno [21], así como otros micronutrientes y factores de crecimiento que contribuyen al aumento de la producción [6]. La primera actividad es evaluar la producción de zeaxantina con el agregado de inductores, partiendo de un medio de cultivo ya probado por el equipo de trabajo. En bacterias, los carotenoides son sintetizados de novo a partir de terpenoides a través de la vía MEP (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate). Se ha identificado que la formación de precursores de los isoprenoides se inicia con la condensación de piruvato y D-gliceraldehído-3-fosfato para producir 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfato (DOXP), paso catalizado por la DOXP sintetasa. Dicha enzima es tiamina dependiente y además es precursora de la formación de tiamina (vitamina B1) y piridoxol (vitamina B6) [22]. Por lo tanto, se plantea que la presencia de estas vitaminas en el medio podrían tener un efecto positivo en la producción de zeaxantina. En otros trabajos se ha reportado para cepas de *Flavobacterium multivorum* un aumento de la producción de zeaxantina

con el agregado en el medio de cultivo de intermediarios del ciclo del ácido cítrico (ácido isocítrico, ácido málico y alfa-ketoglutarato) [6]. La metodología propuesta involucra un diseño experimental de Plackett-Burman en busca de identificar los factores (vitaminas B1 y B6, intermediarios del ciclo del ácido cítrico) que tengan efecto en la producción de zeaxantina. Se evaluarán los factores en un nivel de ausencia como nivel bajo y niveles de referencia en la literatura como nivel alto (0,3 mg/L para las vitaminas y 10 mM para ácido isocítrico, ácido málico y alfa-ketoglutarato). De los factores que resulten tener un efecto positivo, se seleccionarán aquellos 3 que tengan el mayor peso en la respuesta y se optimizará través de la metodología de superficie de respuesta. Estas experiencias se llevarán a cabo en matraces agitados y las respuestas a estudiar serán: producción de biomasa (g/L), contenido de carotenoides (mg/g), producción de zeaxantina (mg/L) y productividad volumétrica de zeaxantina (mg/Lh). Estas respuestas serán los indicadores cuantificables para la evaluación de los resultados, los cuales serán comparados con los disponibles en literatura, para otras especies de *Flavobacterium*.

Con el medio de cultivo ya definido en esta etapa, se pasará a la fermentación a nivel de bioreactor de laboratorio operando en modo batch, donde se estudiarán los requerimientos de oxígeno para el crecimiento microbiano y la formación de zeaxantina. La hidroxilación del betacaroteno y betacriptoxantina, los cuales son los dos últimos pasos de la vía metabólica para la síntesis de zeaxantina son dependientes del oxígeno [4] y también es un factor limitante para el crecimiento celular, ya que *Flavobacterium* sp. es aerobia. Se estudiará la influencia de la concentración de oxígeno, ensayando las siguientes condiciones: sin control de oxígeno, y dos niveles de oxígeno disuelto (10% y 30% de saturación) mantenidos por el sistema de control del biorreactor mediante variación en la velocidad de agitación.

Como último punto a evaluar en el proceso de fermentación, se ensayarán como modo alimentación la estrategia "fed-batch", con el agregado de pulsos de nutrientes en la fase exponencial tardía, de manera de determinar si es posible extender la fase de producción de carotenoides. En trabajos anteriores se observó que el contenido de carotenoides varía con el tiempo, aumentando durante la fase exponencial y estacionaria, la cantidad y la proporción de zeaxantina en la biomasa al disminuir la de los intermediarios.

A partir de los ensayos anteriores, se espera contar con la mayor cantidad de información que permita un mejor control de proceso de producción. Se espera conocer a partir de la formulación del medio de cultivo, cuál/es es/son sustrato/s limitante y efecto de los inductores. Además los requerimientos de oxígeno y su impacto en control del proceso. Una vez conocidas las variables que afectan el bioproceso de producción de zeaxantina de la cepa de *Flavobacterium*, se realizará el modelado de la cinética de crecimiento y producción de pigmento. Se evaluarán diferentes modelos tomados de bibliografía, de manera de encontrar el que mejor se ajuste a los datos experimentales. De esta forma, se pretende tener una expresión matemática que prediga el comportamiento del sistema.

La extracción del pigmento de la matriz celular es un paso fundamental a la hora de evaluar el proceso tanto en el aspecto técnico como económico. Los métodos tradicionales para la extracción de carotenoides tienen grandes desventajas, son laboriosos, requieren largos tiempos de extracción y usan grandes cantidades de solventes orgánicos. En muchos casos, también presentan baja selectividad y bajos rendimientos de extracción. Debido a estas desventajas, se plantea en la presente propuesta la integración al proceso de la extracción de los carotenoides con la tecnología de fluidos supercríticos. Los fluidos supercríticos se caracterizan por tener una viscosidad relativa baja y un coeficiente de difusión alto comparado con los solventes orgánicos convencionales, lo que favorece su desempeño como solvente para extracción. La densidad de estos fluidos debe ajustarse mediante variaciones de temperatura y presión, permitiendo ajustar sus propiedades de selectividad frente a varios compuestos [19]. Dado que el solvente supercrítico opera a altas presiones, la separación entre soluto y solvente se realiza en forma muy simple y eficiente por la simple descompresión del sistema. Los carotenoides se extraerán de la biomasa liofilizada y se utilizará CO<sub>2</sub> como solvente de extracción. Se estudiará a través de un diseño experimental de tres factores, el efecto de la temperatura (entre 40 y 60°C), la presión (entre 200 y 400 bar) y el agregado de etanol como co-solvente (10%). La respuesta a estudiar será cantidad de carotenoide extraído por gramo de biomasa seca. Los resultados se compararon con el método de extracción utilizado actualmente por el grupo de trabajo, que es la extracción directa sólido-líquido con metanol. Con los resultados de las actividades anteriores, se estudiará la viabilidad económica de la propuesta y se evaluará el impacto de las etapas en el proceso global.

Métodos analíticos.

La producción de biomasa se seguirá por densidad óptica a 600 nm. Las concentraciones de zeaxantina y demás carotenoides en la biomasa se determinarán por HPLC en una columna de fase reversa (C18 y C30), con un método optimizado previamente por el equipo de trabajo.

## Resultados, análisis y discusión

Para comenzar las actividades, se realizó un estudio en matraces agitados de manera de determinar las mejores condiciones de fermentación en cuanto a la cantidad de sustrato (glucosa) óptimo para el crecimiento y producción de zeaxantina y carotenoides totales, así como también la relación volumen de medio de cultivo (mL) y volumen de matraz (L) que favorece la disponibilidad de oxígeno en matraces agitados. Este último factor es muy importante ya que, como se ha visto con anterioridad en bibliografía y en el grupo de trabajo, la producción de carotenoides, y en especial de la zeaxantina, está estrechamente ligada a la disponibilidad de oxígeno en el cultivo. Se determinó que con un descenso de 30% a 10% de volumen de medio con respecto al volumen del matraz se alcanza un incremento del 100% en el contenido de zeaxantina y betacriptoxantina. En cuanto al contenido de carotenoides totales, solo se presentó un incremento del 27%. No hubo diferencias significativas en la concentración de biomasa alcanzada.

Se estudió la influencia de la concentración de glucosa inicial en el medio de cultivo en el rango de 10 g/L a 60 g/L. La máxima concentración de glucosa consumida fue 15 g/L y se determinó inhibición por sustrato a partir de los 30 g/L. La concentración de biomasa final fue similar para todas las concentraciones ensayadas. Sin embargo la velocidad específica de crecimiento disminuyó cuando los microorganismos eran cultivados a concentraciones de glucosa inicial mayores a 30 g/L. Los mayores contenidos de zeaxantina, betacriptoxantina, betacaroteno y carotenoides totales se obtuvieron trabajando con una concentración de glucosa inicial de 10 g/L. A partir de 20 g/L no se presentaron diferencias significativas.

Las actividades continuaron con el estudio de la influencia de inductores sobre el crecimiento y producción de carotenoides. La metodología se basó en estudiar ausencia o presencia del inductor, para luego realizar un diseño experimental con los tres que presentaron mayor influencia sobre las respuestas estudiadas. Se ensayaron tres vitaminas: tiamina, piridoxina y biotina. El análisis estadístico tuvo como resultado que la Biotina es la única de las tres vitaminas con efecto significativo en la producción de carotenoides.

Luego, se continuó con el estudio de la utilización de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico (malato, fumarato, succinato, alfaetoglutarato, piruvato, oxalacetato, acetato y citrato) y aminoácidos como promotores de la producción de carotenoides y crecimiento celular. El análisis de varianza determinó que los tres inductores que tuvieron un efecto positivo son serina, valina y piruvato. La concentración óptima que maximiza el contenido de zeaxantina y carotenoides totales de estos tres compuestos en la formulación del medio de cultivo se determinó a través de un diseño experimental, siendo para serina 5mM, valina 15 mM y piruvato 10mM.

Por otro lado, se estudió la posibilidad de sustitución de la peptona y el extracto de levadura (fuentes de nitrógeno previamente optimizadas para este microorganismo) por "corn steep liquor (CSL)", un componente complejo que ha sido ampliamente estudiado en diversos procesos biológicos como fuente de nitrógeno y factor nutricional de bajo costo. Para realizar este estudio, se realizaron ensayos de sustitución parciales y completos para evaluar el desempeño de *Flavobacterium P8* para la producción de zeaxantina y carotenoides totales. La sustitución total del extracto de levadura y peptona por 8 g/L de CSL resultó en la mayor acumulación de zeaxantina y carotenoides totales, con respecto a las sustituciones parciales y el medio control. Sin embargo, el crecimiento celular se vió desfavorecido por esta sustitución, siendo mayoritario en el medio control. Con estos resultados, se puede apreciar una relación inversa entre el crecimiento celular y la producción de carotenoides y zeaxantina. Esto puede deberse a que *Flavobacterium P8* es una bacteria aerobia, demandando oxígeno para el crecimiento celular. El oxígeno también es necesario para la conversión de betacaroteno a betacriptoxantina y de betacriptoxantina a zeaxantina. Sin embargo, a mayor cantidad de biomasa, esta consumirá más oxígeno para crecimiento, mantenimiento celular y formación de productos. Por lo tanto, la concentración de oxígeno disponible podría no haber sido suficiente para la formación de carotenoides y la hidroxilación a zeaxantina, resultando en una menor acumulación a mayor concentración de biomasa.

Se incrementó la concentración de CSL de manera de estudiar si era posible mejorar los resultados obtenidos. Se ensayaron concentraciones de 15, 20 y 25 g/L de CSL. Los mejores resultados fueron obtenidos para una concentración de CSL de 25 g/L, alcanzando una concentración de biomasa de 5 g/L, un contenido de zeaxantina de 840 ug/g y una concentración de zeaxantina por litro de medio de cultivo de 4 mg/L.

El medio de cultivo formulado en matraces fue escalado a un biorreactor de laboratorio. Sin embargo, no se lograron incrementar los rendimientos obtenidos en matraces. Esto podría deberse a una deficiencia de nutrientes y no a la disponibilidad de oxígeno, ya que en el biorreactor se trabajó a una concentración de oxígeno disuelta de 10% de la concentración de saturación, la cual había sido previamente determinada como óptima.

En cuanto a los ensayos de extracción con dióxido de carbono supercrítico (SCF), los rendimientos obtenidos fueron muy bajos, con respecto a la extracción tradicional la cual se realiza con metanol en un molinillo de bolas. Sin embargo, se obtuvieron algunos resultados preliminares a destacar. La SCF logró una extracción diferencial de los carotenoides con respecto a otros pigmentos, denominados flexirrubinas, que son extraídos en la extracción tradicional en molino. Este

resultado es promisorio, ya que facilitaría la purificación del extracto de carotenoides en etapas posteriores. Las extracciones SCF utilizando metanol o etanol como cosolvente favorecieron la extracción de betacaroteno, el componente más apolar de la mezcla, con respecto a la betacriptoxantina y a la zeaxantina. Se extrae solo un 4% y un 0.2% de zeaxantina con SCF utilizando etanol y metanol como co-solvente, respectivamente. Para el caso del betacaroteno, se incrementa su extracción con SCF con respecto al método tradicional en molino. Los bajos rendimientos de la extracción pudieron deberse a una gran compactación del material por su pequeño tamaño de partícula y baja densidad.

### **Conclusiones y recomendaciones**

Se estudió la producción de zeaxantina y carotenoides totales a partir de una cepa de *Flavobacterium* sp. aislada de la Antártida. Las principales conclusiones obtenidas son:

- 1 - El crecimiento de *Flavobacterium* P8 y la producción de zeaxantina y carotenoides totales se vió inhibida por la concentración de sustrato en el medio de cultivo, siendo 10 g/L de glucosa la concentración adecuada para la producción de zeaxantina y carotenoides y 30 g/L para la producción de biomasa.
- 2 - Vitaminas previamente reportadas como estimulantes de la formación de carotenoides no presentaron un efecto significativo.
- 3 - Los aminoácidos valina y serina tuvieron un efecto estimulante en la acumulación de zeaxantina y carotenoides totales por gramo de biomasa.
- 4 - La presencia de piruvato en el medio de cultivo también presentó un efecto estimulante en la carotenogénesis.
- 5 - Se optimizaron las concentraciones de estos tres compuestos de manera de incrementar la producción de carotenoides.
- 6 - La sustitución de peptona y extracto de levadura por jarabe de maíz de alta fructosa presentó un efecto positivo en la acumulación de carotenoides. Sin embargo, no estimuló el crecimiento celular. El escalado a biorreactor no mejoró los rendimientos.
- 7 - No se lograron resultados favorables en la extracción con flúidos supercriticos. Sin embargo, se observó una extracción diferencial de los carotenoides con respecto a las flexirrubinas, las cuales son co-extraídas con la extracción sólido-líquido tradicional, facilitando los pasos posteriores de purificación. Se continuará trabajando en encontrar las causas de este bajo rendimiento, de manera de poder integrar esta tecnología al proceso.

## Referencias bibliográficas

- [1] "Carotenoids Market Trends," Global Industry Analysts, Inc.
- [2] Venil, C. K., Zakaria, Z. A. and Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochem*, 48(7), 1065–1079.
- [3] Britton, G. (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.*, 9 (15), 1551–1558
- [4] Sajilata M. G., Singhal R. S. and. Kamat M. Y (2008) The Carotenoid Pigment Zeaxanthin—A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* (1), 29–49.
- [5] Johnson E. A. and Schroeder W. A. (1996) Microbial carotenoids. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 53, 119–178.
- [6] Bhosale, P., Larson, A.J. and Bernstein, P.S. (2004) Factorial analysis of tricarboxylic acid cycle intermediates for optimization of zeaxanthin production from *Flavobacterium multivorum*. *J Appl Microbiol* 96(3), 623–629.
- [7] Shepherd, D., Dasek, J., & Carels, M. S. C. (1976). U.S. Patent No. 3,951,743. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- [8] Macas-Sánchez, M. D., Mantell, C., Rodríguez, M., de La Ossa, E. M., Lubián, L. M., and Montero, O. (2005). Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. *J Food Eng*, 66(2), 245-251.
- [9] <http://www.alga.cz/>
- [10] Cohen, J. H., Kristal, A. R. and Stanford, J. L. (2000). Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.*, 92(1), 61-68.
- [11] Nishino, H. (1999). Cancer prevention by natural carotenoids. In *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, 231-238.
- [12] Miller N. J., Sampson J., Candeias L. P., Bramley P. M. and Rice-Evans C. A. (1996) Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls, *FEBS Lett.*, 384 (3), 240–242.
- [13] Krinsky N. I. (1978) Non-Photosynthetic Functions of Carotenoids, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 284, (1002), 581–590.
- [14] Subczynski W. K., Markowska E., Gruszecki W. I. and Sielewiesiuk J. (1992) Effects of polar carotenoids on dimyristoylphosphatidylcholine membranes: a spin-label study, *Biochim. Biophys. Acta*, 1105(1), 97–108.
- [15] Jagannadham M. V, Chattopadhyay M. K., Subbalakshmi C., Vairamani M., Narayanan K., Rao C. M., and Shivaji S. (2000) Carotenoids of an Antarctic psychrotolerant bacterium, *Sphingobacterium antarcticus*, and a mesophilic bacterium, *Sphingobacterium multivorum*., *Arch. Microbiol.*, 173(5-6), 418–424.
- [17] Masetto A., Flores-Cotera L. B., Díaz C., Langley E., and Sanchez S. (2001) Application of a complete factorial design for the production of zeaxanthin by *Flavobacterium sp.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 92, (1), 55–8, 2001.
- [18] Porter W. L. (1993) Animal feed additives, US5374425 A.
- [19] Herrero, M., Cifuentes, A., and Ibañez, E. (2006). Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chem.*, 98(1), 136-148.
- [20] "US Pharmacopeia 38 <467> Residual solvent."
- [21] Alcantara, S., and Sanchez, S. (1999). Influence of carbon and nitrogen sources on *Flavobacterium* growth and zeaxanthin biosynthesis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23(1), 697-700.
- [22] Sprenger, G. A., Schörken, U., Wiegert, T., Grolle, S., de Graaf, A. A., Taylor, S. V. Begley, T. P., Bringer-Meyer, & S. Sahm, H. (1997). Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94(24), 12857–12862.

## Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)