



02072
1/287
RECEIVED EN
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

UACPyP-CCH

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

"ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS FACTORES
NUTRICIONALES SOBRE LA PRODUCCION DE
ZEAXANTINA EN UNA CEPA PRODUCTORA DEL
CAROTENOIDE"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

SERGIO JULIAN ALCANTARA PEREZ

MEXICO, D. F.,

1995



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

lo importante es reir...y reir juntos

el sistema, que no da de comer, tampoco da de amar:
a muchos condena al hambre de pan y a muchos más con
dena al hambre de abrazos

...todos, toditos, tenemos algo que decir a los dem
ás, alguna cosa que merece ser escuchada: celebrada
o perdonada

rosalía, antonio, alvaro, laura, mayte, marcela
amigas, amigos

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS BAJO LA SUPERVISION DEL DR. SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL.

Índice

Resumen.....	4
I. Introducción.....	5
II. Objetivos.....	19
III. Estrategia.....	20
IV. Material y métodos.....	21
V. Resultados y discusión de resultados.....	26
VI. Conclusiones.....	49
Bibliografía.....	50

RESUMEN.

Con la finalidad de identificar fenómenos de regulación de la biosíntesis de zeaxantina, se estudió el efecto que tienen los factores nutricionales del medio de cultivo sobre la síntesis de este carotenoide en *Flavobacterium* sp. Este microorganismo presenta la característica que del total de sus carotenoides el 90% corresponde a zeaxantina, la cual se usa en alimentación animal.

El trabajo consistió en diseñar un medio químicamente definido (MM) que permitiera evaluar, con un mínimo de interferencia, la acción de los principios nutricionales del medio. Para ello se implementó un diseño para los 20 aminoácidos de las proteínas, lo que permitió determinar la importancia que tienen la asparagina o glutamina para el crecimiento celular de la cepa. Estos resultados condujeron además a conocer los requerimientos celulares por glucosa, azufre y magnesio. En el caso de la glucosa, cabe señalar que en presencia de los aminoácidos esta fuente de carbono fue determinante para obtener un incremento considerable en el crecimiento celular y la producción del pigmento. Una vez obtenido este MM, se estudió el efecto de concentraciones crecientes de glucosa, amonio, fosfato y asparagina con la finalidad de observar algún posible efecto sobre la síntesis del carotenoide. Sólo en glucosa se observó un efecto negativo sobre la producción de zeaxantina en concentraciones de 80 mg/ml de este carbohidrato. Es importante señalar que las concentraciones crecientes de asparagina permitieron incrementar gradualmente tanto el crecimiento del microorganismo como la síntesis del pigmento, al mismo tiempo que se excretaron concentraciones crecientes de amonio inorgánico en el medio. Esto indicaba que posiblemente el aminoácido estaba siendo utilizado como fuente de carbono. Estos resultados llevaron a tratar de determinar la forma en que el aminoácido es utilizado por el microorganismo y con ello establecer una característica importante de su metabolismo celular.

Debido a que la asparagina cuando se utiliza como fuente de carbono se incorpora al ciclo de Krebs vía oxalacetato, se probaron en presencia de glucosa, diferentes intermediarios del ciclo de Krebs y de la glucólisis con y sin adición de asparagina. Los resultados mostraron que en concentraciones de 10 mM, los intermediarios del ciclo de Krebs y el producto final de la glucólisis, el piruvato, utilizando al cloruro de amonio como fuente de nitrógeno, permiten obtener resultados similares en crecimiento celular y la producción de pigmento que cuando se utiliza asparagina. Esto indicó que posiblemente, ya que los experimentos realizados no permiten discernir con precisión, la asparagina es utilizada como fuente de carbono incorporándose al ciclo de los ácidos tricarbóxicos vía oxalacetato.

Finalmente se evaluó la posibilidad de eliminar a la glucosa del medio sin asparagina. Para ello se utilizó una concentración de 55 mM de los siguientes compuestos: citrato, succinato, piruvato, sacarosa, glucosa y xilosa. Los resultados mostraron que el microorganismo fue capaz de crecer y producir en: citrato, succinato y piruvato en proporciones similares a las condiciones con glucosa-citrato, glucosa-aminoácido. De estos resultados fue posible obtener una nueva formulación del medio mínimo utilizando al citrato (55 mM) como fuente de carbono y al cloruro de amonio (20 mM) como fuente de nitrógeno.

I. INTRODUCCION

En los últimos años se ha incrementado el uso de aditivos de origen natural en alimentos. Entre estos, los colorantes tienen una especial importancia dado el amplio uso del que son objeto y también como consecuencia de la prohibición del uso de la mayoría de los pigmentos rojos y amarillos sintéticos en alimentos y cosméticos por la Food and Drug Administration (FDA), debido a sus efectos nocivos sobre la salud.¹

Los carotenoides son uno de los grupos más importantes de pigmentos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son responsables de la coloración del amarillo al rojo de la frutas y flores y se encuentran también en muchos organismos no fotosintéticos, incluyendo a los hongos (Bramley y Mackenzie, 1992). Estos pigmentos poseen un gran interés comercial por sus amplias posibilidades de aplicación en la industria de alimentos, en medicina y la industria farmacéutica.

Se han utilizado varios microorganismos para el estudio de la biosíntesis y producción de carotenoides. En este sentido, la producción de zeaxantina por el género *Flavobacter* ha despertado interés, tanto de investigación como de aplicación industrial, debido a que algunas especies de este género de sus carotenoides totales el 95% corresponde a este pigmento.

La zeaxantina se utiliza principalmente en alimentación animal como suplemento en raciones para aves (pigmentación de yema de huevo y piel) y en peces (pigmentación de piel). En la actualidad se conoce muy poco sobre el efecto que ejercen los factores nutricionales sobre la síntesis de este carotenoide y menos aún sobre fenómenos de regulación del mismo. Por ello se planteó una investigación que permita caracterizar y sistematizar las condiciones de producción de zeaxantina por *Flavobacterium* sp.

El presente trabajo tuvo como principal objetivo el de estudiar el efecto de los factores nutricionales sobre la síntesis de zeaxantina en una cepa de *Flavobacterium* sp, información que no se ha reportado por ningún grupo hasta el momento.

A. LOS CAROTENOIDES.

Los carotenoides son un grupo de pigmentos que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y animal. Se conoce la estructura de más de 200

¹ En los principios de la década de los '70 se iniciaron los estudios sobre la toxicidad de los colorantes sintéticos, lo cual marcaría una tendencia al cambio en los patrones de consumo de los mismos, enfatizando la necesidad de utilizar los provenientes de fuentes naturales. En el primer año de esta década, dos grupos de investigación reportaron que el colorante Rojo no. 2 o amaranto tenía efectos cancerígenos y embriotóxicos. De este modo en 1980 sólo se permitió el uso de 7 colorantes sintéticos en Estados Unidos de América. (Noonan y Meggos, 1980; Noonan, 1980)

carotenoides naturales, así como la de algunos que han sido modificados químicamente para emplearlos como colorantes en la industria de alimentos. (Badui, 1980; Bramley y Mackenzie, 1990)

Estos pigmentos son tetraterpenos liposolubles formados por la condensación de unidades isoprenilo. Presentan una variedad de coloración que comprende del amarillo al rojo. Son clasificados en dos grupos: los carotenos y las xantofilas. Los primeros son compuestos hidrocarbonados constituidos principalmente por tres isómeros α , β y γ -caroteno, siendo el más común el β -caroteno. Las xantofilas son derivados oxigenados de los carotenos y forman alcoholes, aldehídos y cetonas; presentan una estructura muy parecida al β -caroteno (IUPAC y IUPAC-IUB, 1971). Los carotenoides más comunes en la naturaleza se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Carotenoides más comunes en la naturaleza.

NOMBRE	FUENTE NATURAL
Fucoxantina	Algas
Luteína	Cempasúchitl (<i>Tagetes erecta</i>)
Violaxantina	Plantas verdes
β -caroteno	Ampliamente distribuido
Zeaxantina	Ampliamente distribuido
Licopeno	Tomates
Capsantina	Pimentón
Bixina	Achiote
Criptaxantina	Naranjas, maíz

Badui, 1981.

La importancia de los carotenoides se debe no solamente al hecho de impartir color al alimento, sino también por ser uno de los precursores más importantes de la vitamina A en el ser humano. (Erdam y Col., 1988). Ya que si bien, los vegetales y los microorganismos poseen los mecanismos necesarios para su síntesis, los animales superiores al carecer de ellos, tienen necesidad de su consumo. Por otro lado, su

utilidad también es relevante en el campo de la medicina (Krinsky, 1987; Stich y Col., 1984; Bertram y Col., 1987) e industria farmacéutica (Schwartz y Col., 1989)

En la industria de alimentos se utilizan principalmente como fuentes precursoras de la vitamina A. También son útiles como aditivos para intensificar o modificar el color de un grupo considerable de alimentos y como suplemento en alimentación animal (Nelis y De Leenheer, 1991; Ninet y Renaut, 1979). En el cuadro 2 se presentan los principales carotenoides utilizados como aditivos en alimentos, así como la fuente de su obtención. En el campo de la medicina se ha reportado un efecto de fotoprotección (Will y Scovel, 1987), propiedades anticancerígenas (Bertram y Col., 1987; Kaplan y Col., 1990), incremento de la respuesta inmune (Krinsky, 1987) y un aumento en la longevidad en mamíferos (Cutler, 1984). Al mismo tiempo, en la industria farmacéutica se utilizan principalmente en la preparación de cosméticos (Schwartz y Col., 1989).

B. BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES.

Los estudios de la biosíntesis de colesterol, permitieron elucidar los mecanismos de biosíntesis de estos terpenos (Lehninger, 1981). Por otro lado, la vía de carotenogénesis así como algunos aspectos de su regulación se han estudiado principalmente en sistemas microbianos y en plantas (Schwartz y Col., 1989), lo que ha revelado que estos mecanismos son similares tanto en plantas superiores como en algas, hongos y bacterias (Goodwin, 1971).

La acetil coenzima A es el precursor no sólo de los ácidos grasos, esteroides y prostaglandinas, sino también de otros muchos productos naturales, particularmente los terpenos y las acetogeninas (Lehninger, 1981). En la figura 1, se presenta la importancia de el acetil-CoA como precursor de estos compuestos.

En la biosíntesis de los carotenoides se pueden distinguir tres etapas (Fig. 2): a) la formación de ácido mevalónico por condensación de tres moléculas de acetil-CoA; b) la conversión del ácido mevalónico en geraniil-geraniil pirofosfato a través de reacciones de fosforilación, isomerización y condensación, y; c) la formación del primer tetraterpeno denominado fitoeno, que en función del organismo, plantas, algas, levaduras, hongos o bacterias, sufrirá cambios para generar diversos tetraterpenos. Al respecto se reporta que los β -carotenos se sintetizan por hongos y algas, mientras que las xantofilas por algas, levaduras y bacterias (Goodwin, 1971).

En la ruta de biosíntesis de los carotenos presentada en la figura 2, cabe destacar los siguiente (Goodwin, 1971; Ninet y Renaut, 1979; Schwrtz y Col., 1989):

Cuadro 2. Principales carotenoides utilizados como aditivos en alimentos.

PIGMENTOS	FUENTES NO MICROBIANAS	FUENTES MICROBIANAS	USO
β -caroteno	Zanahoria Sintético	<i>Blakeslea trispora</i> <i>Dunaliella salina</i>	Colorantes en alimentos
Licopeno	Tomates	<i>Blakeslea trispora</i> <i>S. chrestomyceticus</i>	Colorantes en alimentos
Luteína	Alfalfa Maíz Plantas verdes Cempasúchitl	<i>Spogiococcum exentricum</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Alimentación de aves
Zeaxantina	cf. luteína	<i>Flavobacterium</i> sp.	Alimentación de aves y peces
Canthaxantina	Crustáceos Pluma de aves Sintética	<i>Cantharellus cinnabarinus</i> <i>Brevibacterium</i> KY-4313	Alimentación de aves y peces
Aslaxantina	Crustáceos Pluma de aves Flores de <i>Adonis annua</i> Sintética	<i>Micobacterium lacticola</i> <i>Brevibacterium</i> 103 <i>Phaffia rhodozyma</i> <i>Piniphora</i> sp.	Alimentación de peces
Rodoxantina	Hojas verdes Pescado (Tilapia)	--	--
Capxantina	Paprika	--	Colorantes en alimentos Alimentación de aves
Bixina	Biza orellana	--	Colorantes en alimentos
Crosetina	Azafrán	--	Colorantes en alimentos
β -Apo-8-carotenil	Sintético	--	Colorantes en alimentos
β -Apo-8-carotenil ácido etil ester	Sintético	--	Colorantes en alimentos

Nelis and DeLeener (1991)

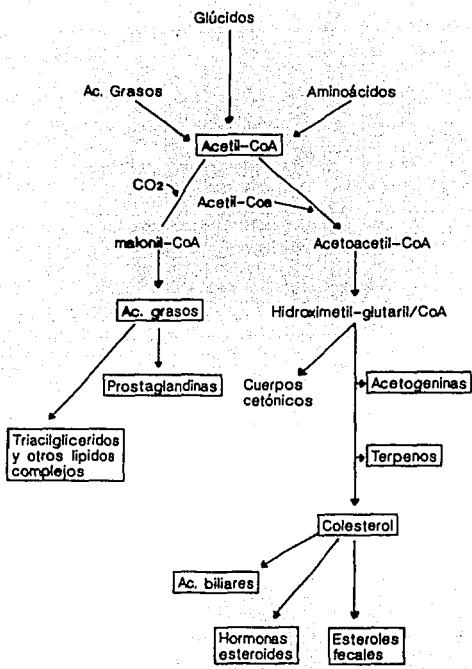


Figura 1. El acetil-CoA como precursor clave de la biosíntesis de numerosos lípidos.

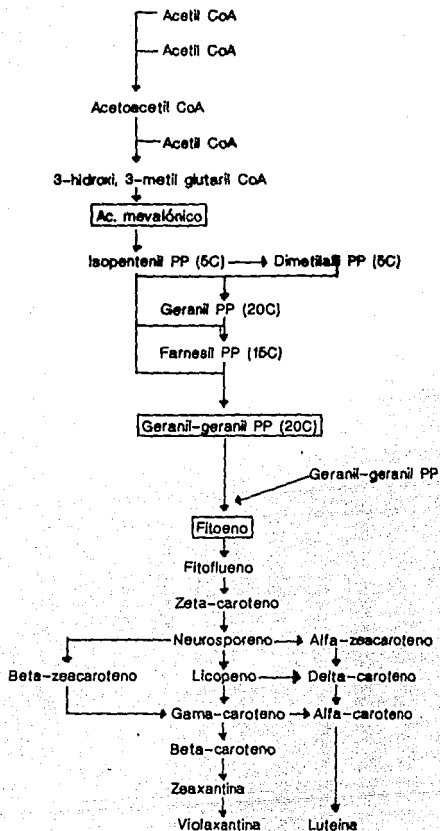


Figura 2. Ruta de la biosíntesis de carotenoides

I) El ácido mevalónico se forma por condensación de tres moléculas de acetil-CoA. El producto intermediario clave de estas reacciones es el 3-metil,3-metil glutaril-CoA (HMG-CoA), el cual se reduce por la acción de una reductasa para formar el mevalonato.

II) El ácido mevalónico, considerado el primer precursor específico de todos los terpenoides, se fosforila por el ATP, inicialmente para formar un ester 5-monofosfato. Una segunda fosforilación, también por el ATP, forma un compuesto 5-pirofosfato que por una descarboxilación formará el isopentenil pirofosfato (IPP). Para la construcción de los terpenoides precursores a partir del IPP, el primer paso es la isomerización de este compuesto a dimetil alil pirofosfato (DAPP) que actúa como el iniciador de la elongación de la cadena.

La enzima prenil-transferasa transfiere una molécula de IPP a DAPP para formar geranil pirofosfato (GPP). La posterior transferencia de una molécula de IPP a GPP conduce a la formación de farnesil pirofosfato (FPP), que finalmente formará, por una nueva transferencia de IPP, geranil geranil pirofosfato (GGPP). Por último dos moléculas de GGPP se condensarán generando el fitoeno, primer molécula de síntesis con 40 átomos de carbono.

III) La desaturación secuencial de fitoeno a licopeno en plantas superiores y algas, implica una serie de deshidrogenaciones que producen en sucesión: fitoflueno, ζ -caroteno, neurosporeno y licopeno. En ciertas bacterias fotosintéticas el ζ -caroteno se reemplaza por su isómero asimétrico el 7,8,11,12-tetrahidroxillicopeno, mientras que en otras bacterias y hongos ambos isómeros están presentes. Por otra parte se ha visto que el licopeno puede ciclarse para formar el γ -caroteno y después el β -caroteno.

C. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE CAROTENOIDES POR LOS NUTRIMENTOS DEL MEDIO DE CULTIVO: CARBONO, NITROGENO Y FOSFATO.

La mayoría de los estudios sobre la regulación de la biosíntesis de carotenoides se ha realizado en hongos. Estos trabajos reportan diferentes mecanismos de regulación de la carotenogénesis, que son (Rosas, 1993; Swartz y Col, 1989):

- a) Retroregulación por producto final.
- b) Fotoregulación.
- c) Efecto del oxígeno.
- d) Temperatura.

- e) pH.
- f) Activación o inhibición química.
- g) Factores de crecimiento.
- h) Hormonas o interacción sexual.
- i) Nutrientes en el medio de cultivo.
- k) Efecto del AMP cíclico.

C.1. EFECTO DEL CARBONO.

Rosas (1993), estudió el efecto de diversas fuentes de carbono sobre la síntesis de carotenoides en *Dacrymyces deliquescens*. Observó que en concentraciones del 1% las mejores fuentes de carbono para la síntesis de los pigmentos fueron: D-glucosa, celobiosa y D-xilosa.

Al probar concentraciones del 5%, encontró que la celobiosa, la D-xilosa y el almidón estimularon la producción de carotenoides, debido seguramente a que tanto la celobiosa como el almidón tienen una lenta asimilación, mientras que la xilosa probablemente ejerció este efecto por ser una fuente generadora de poder reductor, importante para la carotenogénesis. A esta misma concentración reportó un efecto negativo por la D-glucosa y el ácido cítrico, que son fuentes de carbono fácilmente asimilables.

Al caracterizar el efecto negativo de la D-glucosa, observó que el azúcar *per se* ejerció una represión transitoria de la carotenogénesis, asumiendo que este efecto de la glucosa se lleva a cabo sobre los primeros pasos de la vía de síntesis, ya que no se alteró cualitativamente el perfil de los pigmentos formados.

Perry y Col. (1986) identificaron un fragmento cromosomal de 12.4 kb en *Erwinia herbicola* que contiene los genes que codifican para la síntesis de un pigmento amarillo. Este fragmento se introdujo en *E. coli* en donde se observó que la expresión de los genes introducidos está sujeta a represión catabólica en presencia de glucosa.

Orange y Monclair (1961) reportaron una amplia variedad de carbohidratos como buenas fuentes de carbono para el crecimiento celular y la producción de carotenoides para los hongos de la familia *Dacrymycetaceae*. Los autores señalan

que la glucosa, la sacarosa y el azúcar invertido generan las mejores respuestas en el crecimiento y la producción.

En la levadura *Phaffia rhodozyma*, Jhonson y Col. (1979) reportaron el efecto de varias fuentes de carbono sobre el crecimiento celular y la producción de carotenoides. Encontraron que la celobiosa, la maltosa y la sacarosa, en ese orden, fueron las mejores fuentes de carbono para la producción de carotenoides; en tanto que la sacarosa y la glucosa promovieron un rápido crecimiento celular. Reportaron también que a concentraciones mayores del 4% de glucosa, se presenta un efecto negativo sobre la producción de astaxantina.

Ruddat y Garber (1983) reportaron que para *Phycomyces Blakesleeanus*, el acetato cuando se utiliza como única fuente de carbono, estimula la producción de carotenoides. Por su parte Goodwin (1959) encontró que para este hongo, tanto la maltosa como la glucosa son carotenogénicos, no así la xilosa y la fructosa que son mucho menos eficientes. En la levadura *Rhodotorula rubra*, el glicerol es la mejor fuente de carbono para la síntesis de carotenoides. Lo mismo se presenta en *Mycobacterium rhodocorou*s.

Dholodai y Modi (1982), al sustituir glucosa por celobiosa, como única fuente de carbono, encontraron que la producción de β -caroteno se incremento 10 veces en el hongo *Blakesleea trispora*. Esto se debió a la lenta liberación de glucosa al medio, resultado de la utilización de celobiosa, ya que la glucosa a niveles de 0.2 M ejerce un efecto negativo sobre la síntesis de carotenoides en este hongo (Danddkar y Modi, 1980). Al estudiar el efecto de la concentración de glucosa a niveles de 0.2 y 0.3 M, estos autores encontraron una menor actividad de mevalonato cinasa comparada con la actividad encontrada en glucosa 0.1 M, lo que sugiere que la inhibición de la síntesis de carotenoides se debe a una represión catabólica.

C.2 EFECTO DEL NITROGENO.

Orange y Monclair (1961) reportaron que para la familia *Dacrymyceteae* la mejor fuente de nitrógeno para la síntesis de carotenos fueron los aminoácidos. Encontraron también que el ácido glutámico y la glicina fueron los más adecuados para este fin.

Señalan además que la incorporación de triptofano a un medio con ácido glutámico es particularmente efectivo en la carotenogénesis.

En cuanto al efecto de las fuentes inorgánicas de amonio sobre la carotenogénesis, reportaron que no existe ningún problema debido al tipo de sal de amonio utilizada. Aunque señalan que fue preferible utilizar el nitrato de amonio.

Chichester y Col. (1959) reportaron que *en Phycomyces blakesleeanus* la leucina y la valina son inductores de la síntesis de carotenoides. En este mismo hongo, Ruddat y Garber (1983), reportaron al extracto de levadura como una fuente de nitrógeno que estimula la carotenogénesis. Goodwin (1959) señaló además que el nitrato de amonio disminuye la producción de pigmento en el hongo.

En *Blakeslea trispora* la leucina resultó una buena fuente de nitrógeno para la síntesis de β -caroteno. Lo mismo sucede con la glicina (Nelis y De Leenheer, 1989).

C.3 EFECTO DEL FOSFATO.

Dholokai y Modi (1984) en un estudio *en Blakeslea trispora* encontraron que al incrementar la concentración de fosfato inorgánico al medio de cultivo, de 0.01 a 1%, la producción de carotenos se incrementó entre 4 y 5 veces. Además el patrón de la síntesis de los carotenos fue el mismo en ambas concentraciones de fosfato.

Los autores observaron que en altas concentraciones de fosfato hay una baja actividad de las fosfatasa asociada a una elevada producción de carotenoides.

D. ZEAXANTINA.

D.1 ESTRUCTURA.

La zeaxantina (3,3-dihidroxi- β -caroteno) es una xantofila de color amarillo, con un peso molecular de 568; es soluble en acetona, cloroformo, eter, petróleo y etanol. Su estructura se presenta a continuación (figura 3):

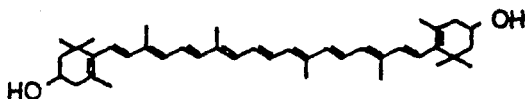


Figura 3. Estructura de la zeaxantina.

D.2 OBTENCION Y USOS

La zeaxantina es un pigmento ampliamente distribuido en la naturaleza. Se ha obtenido de la alfalfa, del maíz y de la flor de cempasúchitl (Nelis y De leenher, 1991). Jungalwala (citado en Narua, 1966) encontró que en las anteras de *Deloxis regia* el 90% de sus pigmentos es zeaxantina. Por otro lado, también se ha encontrado en microorganismos como Cianobacterias y algunas bacterias no fotosintéticas (Diversé-Pierluissi y Krogman, 1988).

El género *Flavobacterium*, que representa a las bacterias de color amarillo (Bergey, 1980), es de especial interés por el elevado porcentaje de zeaxantina que produce. Por ejemplo en el *Flavobacterium* R1560 el 95% de sus carotenoides corresponde a esta xantofila (Britton y Goodwin, 1971). Otro caso es el *Flavobacterium* sp. ATCC 25568 que del total de sus carotenoides, el 90% corresponde a zeaxantina (Scromne y Sánchez, 1991).

Esta xantofila se utiliza principalmente como suplemento en raciones alimenticias para aves y peces: en los primeros para mejorar la coloración de la yema del huevo y de la piel de las aves y en los peces para pigmentación de la piel (Nelis y De Leenheer, 1991).

D.3 BIOSINTESIS.

Britton y Goodwin (1971) utilizaron la cepa de *Flavobacterium* R 1560, una bacteria gram negativa que incorpora eficientemente ácido mevalónico para sintetizar carotenoides, para elucidar los mecanismos de la biosíntesis de xantofilas. De esta manera se estableció que: 1) los grupos hidroxilo se introducen hasta después de la ciclación; 2) se necesita la presencia de oxígeno, y; 3) el licopeno es el precursor inmediato de los carotenoides cíclicos.

Por su parte MacDermott y Col. (1973,1974) han propuesto tres rutas alternativas para la biosíntesis de zeaxantina: a) vía β -zeacaroteno; b) vía β -caroteno y; c) vía licopeno rubixantina. (Figura 3)

La ruta (a) representa la principal vía de la síntesis de zeaxantina, en ella el neurosporeno se cicliza dando lugar a la formación de β -zeacaroteno, el cual se hidroxila a 3-hidroxi- β -zeacaroteno, que después se desatura y se convierte en rubixantina. Por último la rubixantina se cicliza e hidroxila para producir β -criptoxantina y zeaxantina.

La conversión de neurosporeno a β -zeacaroteno se inhibe en altas concentraciones de nicotina en el medio. Se presenta entonces una ruta alterna de síntesis (ruta b). En ella primeramente el licopeno se cicliza para formar δ -caroteno el cual produce β -caroteno que finalmente se hidroxila generando zeaxantina.

La ruta (c) se presenta cuando se inhibe la conversión de γ -caroteno a β -caroteno por la acción de bajas concentraciones de nicotina. Este inhibidor impide la ciclación del γ -caroteno formando entonces rubixantina y finalmente zeaxantina.

D.4 EFECTO DE LOS NUTRIMENTOS SOBRE LA PRODUCCION DE ZEAXANTINA.

Los estudios en *Flavobacterium dehydrogenans* (una bacteria que produce un pigmento amarillo denominado R439), demostraron que para la síntesis de este carotenoide es indispensable la presencia de luz y oxígeno, ya que la producción específica de este compuesto se incrementa cuando se utilizan (Weeks y Garner, 1967; Weeks y Andrewes, 1969).

Por su parte Sholher y Wis (1971), Dasek y Col. (1973), Sheperd y Dasek (1974) y Sheperd y Col. (1974), recomiendan también la utilización de luz y agitación de los cultivos, señalando además que el oxígeno es un factor limitante de la síntesis. Encontraron que la temperatura adecuada para el crecimiento y la producción oscila

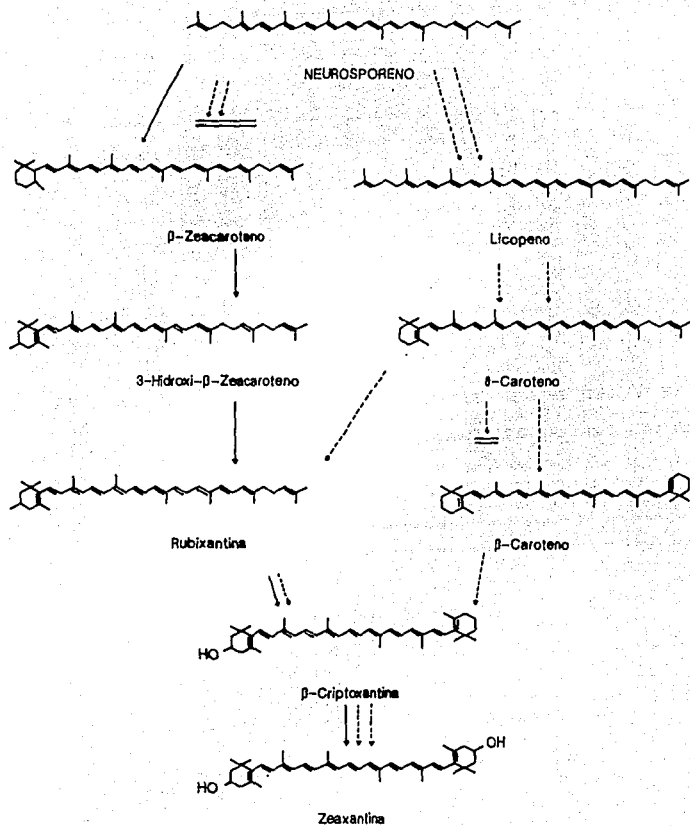


Figura 3. Biosíntesis de zeaxantina. Ruta (a) via β-zeaxaroteno, ruta (b) via β-caroteno y ruta (c) via licopeno y rubixantina.

alrededor de 30 C y el pH adecuado fluctua entre 6 y 8. Respecto a los factores nutricionales señalan lo siguiente:

a) La adición de metionina (0.24 g/l), cistina (0.12 g/l) o cisteina (0.12 g/l) permiten incrementar la producción específica de zeaxantina.

b) La adición de iones divalente como Fe^{++} (0.01 M), Co^{++} (0.001 M) o Mn^{++} (0.002 M) producen un efecto positivo sobre la producción.

c) La adición de piridoxina a niveles de 0.2 g/ml tiene un efecto positivo en la producción.

d) Una combinación de metionina (0.12 g/l) y Fe^{++} (0.01 M) permite incrementar casi tres veces la producción de carotenoides.

e) La fuente de carbono puede ser glucosa o sacarosa en una proporción de 0.1 a 15% en peso, sin presentar ningún efecto adverso a la síntesis del pigmento. Como fuente de nitrógeno se utiliza extracto de levadura, sólidos de cocimiento de maíz en una proporción de 0.1 a 8% en peso. Se adiciona además sulfato de magnesio en una proporción de 0.1 a 2% en peso.

II. OBJETIVOS

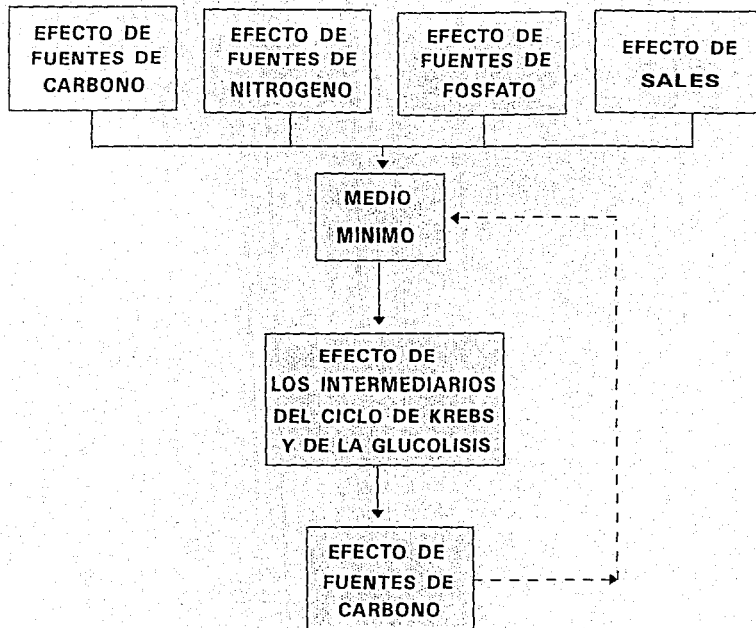
OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de los factores nutricionales sobre la producción de zeaxantina en una cepa de *Flavobacterium* sp.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Diseñar un medio mínimo para *Flavobacterium* sp.
2. Determinar el efecto de diversas fuentes de carbono y nitrógeno sobre el crecimiento celular y la producción de zeaxantina en *Flavobacterium* sp.
3. Determinar el efecto de diferentes sales sobre el crecimiento celular y la producción de zeaxantina en *Flavobacterium* sp.

III. ESTRATEGIA



IV. MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

La cepa empleada corresponde a *Flavobacterium* sp. ATCC 25 582. Obtenida de la American Type Culture Collection.

2. MEDIO DE CULTIVO

El microorganismo se creció en el medio YTN que contenía: glucosa al 0.1%, cloruro de sodio al 3 %, extracto de levadura al 1.0 %, Triptona al 1.0 % y, Elementos traza al 0.1 %. En su caso para cultivo sólido se adicionó 1.5 % de agar.

Las condiciones de cultivo fueron: Matraces Erlenmeyer de 250 ml, con 50 ml de medio, 29 C y 160 rpm de agitación. El cultivo sólido se creció a 29 C.

La composición de los elementos traza fue la siguiente: H₃BO₃ 2.85 g, MnCl₂ 4H₂O 1.80 g, FeSO₄ 1.36 g, Tartrato de sodio 1.77 g, CuCl₂ 2H₂O 26.9 mg, ZnCl₂ 20.8 mg, CoCl₂ 6H₂O 40.4 mg, Na₂MoO₄ 2H₂O 25.2 mg. Disueltos en un litro de agua.

3. INOCULO

A partir de un stock de células, el microorganismo se creció por 48 h en cajas de petri con YTN. Posteriormente se inocularon matraces con YTN y se crecieron por 24 h. Se lavaron las células con solución salina estéril. Finalmente se diluyó la concentración celular hasta obtener una densidad óptica de 1.00. Se sembraron las directas condiciones a evaluar con el 5 % de volumen del inóculo correspondiente al volumen total de la muestra.

4. DISEÑO DEL MEDIO MÍNIMO.

El medio mínimo se implementó utilizando los 20 aminoácidos de las proteínas, en una serie de combinaciones según la siguiente distribución:

1	2	3	4	5	
Gly	Asn	Cys	Met	Gln	6
His	Leu	Ile	Val	Lys	7
Phe	Tyr	Trp	Thr	Pro	8
Glu	Ser	Ala	Asp	Arg	9

El medio utilizado contenía: Glucosa 0.1 %, NH₄Cl 20 mM, K₂HPO₄ 10 Mm, Elementos traza 0.1 %, NaCl 3 %. Cada aminoácido fue adicionado en una concentración de 1 mg/ml.

Las condiciones de cultivo fueron: matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de medio, a 29 C y 160 rpm de agitación. El tiempo de la fermentación fue de 48 h.

a) Una vez obtenida la combinación de aminoácidos requerida para el crecimiento del microorganismo se adicionaron: extracto de levadura en dos concentraciones 0.01 % y 1 %; glucosa también en dos concentraciones 0.1 y 2 %; cloruro de amonio a una concentración de 20 mM según las siguientes condiciones:

1. aa + --- + glu 0.1 %
2. NH₄Cl + --- + glu 0.1 %
3. NH₄Cl + --- + glu 2.0 %
4. aa + EL 0.01 % + glu 0.1 %
5. aa + EL 1.00 % + glu 0.1 %
6. NH₄Cl + EL 1.00 % + glu 0.1 %
7. aa + EL 1.00 % + glu 2.0 %
8. aa + --- + glu 2.0 %
9. NH₄Cl + EL 1.00 % + glu 2.0 %

aa: aminoácidos (Gly, Asn, Gln, Cys, Met)

EL: extracto de levadura

glu: glucosa

b) A continuación, de la combinación de aminoácidos utilizada, se evaluó la posibilidad de la eliminación de glicina del medio de cultivo. Para ello se eliminó del medio y se le comparó con la respuesta de los cinco aminoácidos.

c) Posteriormente se evaluaron todas las combinaciones posibles de los cuatro aminoácidos restantes.

d) A continuación se evaluó una fuente de azufre alternativa a los aminoácidos, esta correspondió al sulfato de magnesio en tres diferentes concentraciones: 1, 3 y 5 mM.

Según las siguientes condiciones:

- | | |
|----------------------|------|
| 1. MgSO ₄ | 1 mM |
| 2. MgSO ₄ | 3 mM |
| 3. MgSO ₄ | 5 mM |

4. Cys	1 mg/ml
5. Cys + MgSO ₄	1 mg/ml-1 mM
6. Cys + MgSO ₄	1 mg/ml-3 mM
7. Cys + MgSO ₄	1 mg/ml-5 mM
8. Asn	1 mg/ml
9. Asn + MgSO ₄	1 mg/ml-1 mM
10. Asn + MgSO ₄	1 mg/ml-3 mM
11. Asn + MgSO ₄	1 mg/ml-5 mM
12. Asn + Cys	1 mg/ml-1mg/ml
13. Asn + Cys + MgSO ₄	1 mg/ml-1 mg/ml-1 mM
14. Asn + Cys + MgSO ₄	1 mg/ml-1 mg/ml-3 mM
15. Ans + Cys + MgSO ₄	1 mg/ml-1 mg/ml-5 mM

e.Finalmente se determinó la importancia del ion magnesio y del sulfato para la cepa comparando la utilización de las siguientes sales: MgSO₄, MgCl₂, K₂SO₄, Na₂SO₄ y MnCl₂ en una concentración de 3 mM.

5. EVALUACION DEL EFECTO DE CARBONO, NITROGENO Y FOSFATO SOBRE LA PRODUCCION DE ZEAXANTINA.

a. Para estas evaluaciones se utilizó el medio mínimo obtenido con la siguiente composición: Glucosa 2%, NaCl 3 %, NH₄Cl 20 mM, MgSO₄ 3 mM, K₂HPO₄ 10 mM, Elementos traza 0.1 % y Asparagina 1 mg/ml. Las condiciones de cultivo fueron las indicadas en el apartado 4.

b. Se evaluaron diferentes concentraciones de glucosa (con y sin adición de cloruro de amonio): de 0 a 10 %; de cloruro de amonio de 10 a 150 mM; de asparagina de 0 a 3 mg/ml y; de fosfato de potasio dibásico de 1 a 100 mM.

6. METABOLISMO DE ASPARAGINA

a)Se evaluó el efecto de diferentes intermediarios del ciclo de Krebs: citrato, oxaloacetato, α-cetoglutarato, malato; y de la glucólisis: piruvato, glucosa-6-fosfato, fructosa-1,6-difosfato en una concentración de 10 mM. Utilizando glucosa al 1% y asparagina, 1mg/ml o cloruro de amonio, 20 mM.

b)A continuación se eliminó la glucosa del medio de cultivo y se evaluaron diferentes fuentes de carbono: glucosa, xilosa, sacarosa, succinato de sodio, citrato de sodio, piruvato de sodio y acetato de sodio. Para ello se utilizó una concentración de 55 mM de cada carbohidrato.

Las condiciones de cultivo fueron: matraces Erlenmeyer de 500 ml con 50 ml de medio, 29 C y 160 rpm de agitación. El tiempo de la fermentación fue de 48 h.

7. METODOS ANALITICOS.

a) El crecimiento se estimó por densidad óptica a una longitud de onda de 540 nm, utilizando un espectrofotómetro Bausch and Lomb E-21.

b) La extracción del pigmento se efectuó según la técnica reportada por Britton (1985). El método consiste en romper mecánicamente una pastilla proveniente de 2 ml de cultivo, agitando en un vortex durante 1 minuto en presencia de aproximadamente 4 gramos de perlas de vidrio y 2 ml de acetona. A los extractos de acetona se les adicionaron 2 ml de una mezcla de éter de petróleo-dietil éter 1:1 v/v, para transferir los carotenoides a esta mezcla. Posteriormente se adicionaron 2 ml de agua destilada para la separación de fases.

La fase etérea o epifase se recuperó con una pipeta Pasteur. Se dejaron evaporar las muestras por espacio de 24 h para finalmente resuspendirlas en etanol absoluto y cuantificarlas espectrofotométricamente a 450 nm utilizando el coeficiente de extinción de 1540 (1%, 1cm).

El cálculo de la concentración del pigmento se realizó aplicando la siguiente fórmula propuesta por Britton (1985).

$$\mu\text{g de carotenoides} = \frac{A(y)(10^6)}{(A\ 1\text{cm})(100)}$$

donde:

A es la absorbancia observada

y es el volumen del extracto en ml

10^6 es una constante para expresar los carotenoides en μg

1 %

$A\ 1\text{cm}$ es el coeficiente de extinción específico para zeaxantina.

100 es una constante para eliminar el factor de por ciento.

c) El amonio se determinó por el método de Berthelot (Neatherburn, 1967). Para la determinación de fosfato se utilizó el método de Summer (Summer, 1944). La glucosa se

cuantificó utilizando el paquete para el diagnóstico enzimático de glucosa en suero GOD-PAD (Erlck).

V. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

1. DISEÑO DE UN MEDIO MINIMO

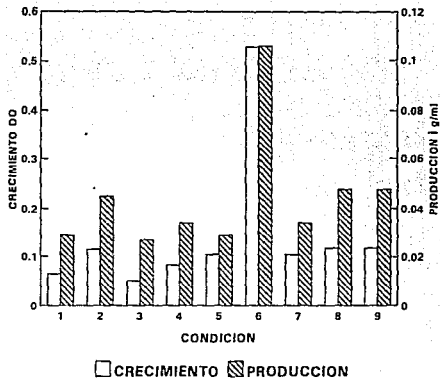
Con la finalidad de evaluar el efecto de aminoácidos sobre el crecimiento y producción de zeaxantina en *Flavobacterium* sp. se aplicó una prueba donde se incluyeron los 20 aminoácidos de las proteínas. Para ello se utilizó un diseño, reportado para estudios de auxotrofia de bacterias (Sherman y Col., 1971), que utiliza nueve diferentes combinaciones de los aminoácidos. Estas combinaciones están dispuestas de tal forma que permiten determinar los requerimientos por uno o más aminoácidos.

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas con aminoácidos. Se observa que la condición que contiene glicina, asparagina, glutamina, cisteína y metionina resultó la más adecuada para el crecimiento y producción del microorganismo. Al parecer esta combinación aporta los requerimientos que necesita el microorganismo para crecer y producir zeaxantina en mayores cantidades que las restantes combinaciones de aminoácidos.

La combinación de aminoácidos encontrada presenta la característica de incluir a dos aminoácidos azufrados: la metionina y cisteína; a dos aminoácidos con un grupo amídico: la glutamina y la asparagina; y el aminoácido más simple de las proteínas: la glicina.

Se eligió la condición 6 y se planteó la posibilidad de incrementar las respuestas en el crecimiento y la producción probando diferentes principios nutricionales: extracto de levadura (0.01 % y 1.0 %), y dos concentraciones de glucosa (0.1 y 2 %). El extracto de levadura al 0.01 % fue utilizado principalmente como fuente de vitaminas; en concentración de 1 % fue utilizado como control, ya que este es una fuente compleja de nutrimentos. La glucosa al 0.1% se utilizó por ser la concentración que se utiliza en el medio complejo (YTN) y en concentraciones del 2% por la limitación de nutrimentos una vez que se han eliminado las fuentes complejas de proteína utilizadas en el medio YTN.

En la figura 5 se presentan los resultados obtenidos al evaluar las diferentes condiciones de cultivo ya señaladas, a partir de la combinación de aminoácidos encontrada. Como puede verse en la figura, la adición de extracto de levadura en concentración de 0.01% no mejoró el crecimiento del microorganismo en los aminoácidos. Sin embargo, al incrementar la concentración del extracto de levadura a 1% se incrementó considerablemente tanto el crecimiento como la producción. Este



CONDICIONES

1	2	3	4	5
Gly	Asn	Cys	Met	Gln
6	7	8	9	
His	Leu	Ile	Val	Lys
Phe	Tyr	Trp	Thr	Pro
Glu	Ser	Ala	Asp	Arg

FIGURA 4. CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE *Flavobacterium* sp. EN DIFERENTES COMBINACIONES DE AMINOACIDOS (LA CONCENTRACION DE CADA AMINOACIDO FUE DE 1 mg/ml).

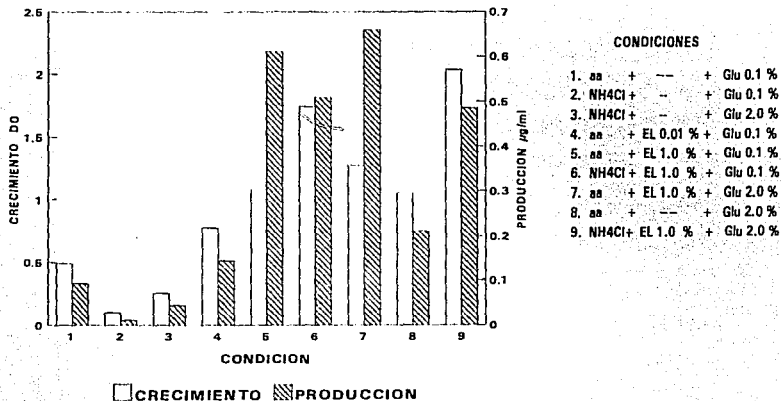


FIGURA 5. CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE *Flavobacterium* sp. EN DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA EVALUACION DE: EXTRACTO DE LEVADURA (EL), CLORURO DE AMONIO (20 mM) Y GLUCOSA, UTILIZANDO CINCO AMINOACIDOS (Asn, Gly, Cys, Met, Gln; UTILIZANDOLmg/ml DE CADA AMINOACIDO).

efecto puede explicarse en términos del aporte de nitrogenado del extracto de lavadura, que de hecho se utiliza en la formulación del medio complejo para el *Flavobacterium* sp. Además se observó que con 1% de extracto de levadura y sustituyendo los aminoácidos por cloruro de amonio, el crecimiento se favoreció considerablemente, no así la producción del pigmento que disminuyó ligeramente.

Por otro lado, al incrementar la concentración de glucosa a 2% se observó que la condición 9 respecto a la condición 1 (control), mejoró significativamente el crecimiento y la producción. Mientras que en las condiciones donde se utilizó extracto de levadura al 1% (comparando condiciones 6-8 y 7-10) una mayor concentración de glucosa también incrementó el crecimiento y la producción, aunque en menor proporción que en la anteriormente señalada. Nuevamente se presentó el mismo efecto de mejoría en el crecimiento y un ligero decremento en la producción al sustituir los aminoácidos por cloruro de amonio.

Es notable la diferencia que existe, cuando se utilizan aminoácidos, al incrementar la concentración de la glucosa del 0.1 al 2%. Este resultado mostró la importancia que tiene la glucosa para el microorganismo cuando es crecido en presencia de aminoácidos, ya que al sustituir los aminoácidos por cloruro de amonio, utilizando 0.1 y 2% de glucosa las respuestas tanto en crecimiento como en producción fueron muy bajas. Esto indica además, que bajo estas condiciones de cultivo el microorganismo no es capaz de utilizar a la glucosa y al cloruro de amonio como únicas fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente lo que se refleja en su escaso crecimiento.

Los resultados mostraban que prácticamente se contaba con un medio químicamente definido. Un medio que contenía aminoácidos como fuente de nitrógeno y posiblemente de carbono y que mejoraba las respuestas en el crecimiento celular y la producción de zeaxantina al incrementar la concentración de glucosa. Sólo restaba determinar la importancia de cada uno de estos aminoácidos, así como las diferentes combinaciones de los mismos. Antes de estas evaluaciones, se planteó la posibilidad de eliminar glicina, lo que permitiría reducir el número de condiciones del experimento (por el número de combinaciones posibles de los aminoácidos). Esto en base a la observación de la estructura y vía metabólica del catabolismo de los aminoácidos, lo que mostraba que el posible aporte de glicina podía ser cubierto por la cisteína. Ambos aminoácidos tienen la misma ruta de catabolismo, sin embargo la cisteína podía resultar de mayor importancia dados sus grupos funcionales (Lehninger, 1981).

En base a esto, se diseñó el experimento por eliminación de la glicina y se comparó con la condición en que estaban presentes los cinco aminoácidos.

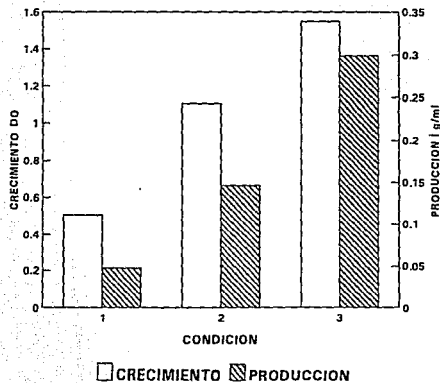
Como se observa en la figura 6, al eliminarse la glicina del medio de cultivo se mejoró tanto el crecimiento del microorganismo como su producción. Lo que hizo suponer que dado el caso, la cisteína puede sustituir a la glicina y que junto a los tres aminoácidos restantes aportan lo que el microorganismo necesita para su crecimiento. Por otro lado, los resultados nuevamente muestran que al disminuir la cantidad de nitrógeno del medio de cultivo el crecimiento celular se vio favorecido.

Una vez definidos los aminoácidos más importantes para las necesidades nutricionales de la cepa, se probaron todas las combinaciones posibles de asparagina, glutamina, cisteína y metionina, así como cada uno por separado. Esto con la finalidad de determinar el requerimiento de la cepa de uno de los aminoácidos o bien una combinación de los mismos. Los resultados obtenidos al evaluar estas diferentes combinaciones se presentan en la figura 7.

Se puede observar que individualmente los diferentes aminoácidos presentan una respuesta menor en crecimiento y producción comparado con las respuestas obtenidas con la adición de los cuatro aminoácidos. Esto seguramente debido a la falta de algún elemento importante para el metabolismo de la cepa que se encuentre como complemento en la combinación de aminoácidos. Las menores respuestas en los parámetros de crecimiento y producción se presentaron tanto en la glutamina como en la asparagina, por su parte la metionina y la cisteína presentaron una mejor respuesta. Considerando que la diferencia más importante entre los aminoácidos son sus grupos funcionales, en un caso la presencia de azufre y otro la presencia de un grupo amídico, es posible que el ion azufre resultase importante en el metabolismo de la cepa.

Al evaluar diferentes combinaciones de dos aminoácidos se observó que las mejores respuestas, tanto en crecimiento como en producción, se presentaron donde se incluyó la cisteína. Encontrándose las más bajas respuestas en aquella condición donde se adicionó la combinación de glutamina y asparagina, lo que sugiere nuevamente la importancia del azufre para la cepa. En las combinaciones donde se incluyeron metionina y los aminoácidos amídicos, se encontraron respuestas intermedias a las ya descritas para cisteína y estos aminoácidos. Esto puede deberse a la forma en que son catabolizados los aminoácidos azufrados por parte del microorganismo.

En las 4 combinaciones de tres aminoácidos nuevamente se observó que las mejores respuestas tanto en el crecimiento como en la producción se presentaron donde se



CONDICIONES

1. aa + glu 0.1 %
2. aa + glu 2.0 %
3. aa + glu 2.0 % - Gly

aa : Asn, Cys, Met, Gln, Gly

FIGURA 6. CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE *Flavobacterium* sp. EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE GLICINA (SE ADICIONA 0.1 mg/ml DE CADA AMINOACIDO).

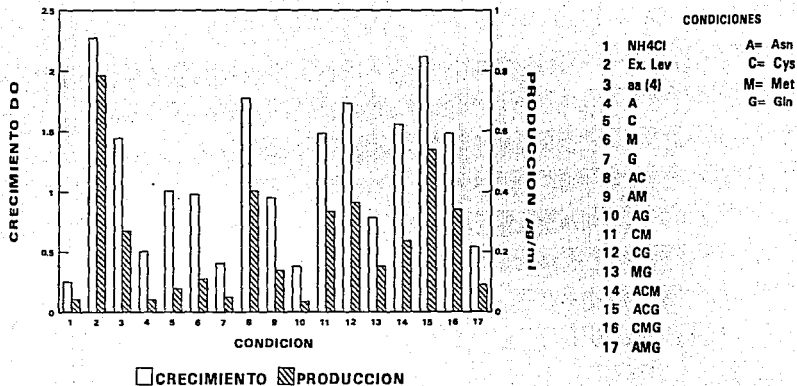


FIGURA 7. CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE Flavobacterium sp. EN DIFERENTES COMBINACIONES DE ASPARAGINA, CISTEINA, METIONINA Y GLUTAMINA. (SE ADICIONA 1 mg/ml DE CADA AMINOACIDO, 20 mM DE NH₄Cl Y 1% DE EXTRACTO DE LEVADURA)

incluyó a la cisteína. Siendo la mejor condición aquella donde no coincidieron metionina y cisteína.

Cuando no se incluyó la cisteína en el medio de cultivo se obtuvieron los más bajos crecimientos y la menor producción.

Como se observa en esta misma figura, la presencia de un aminoácido azufrado es importante para el microorganismo. Sin embargo al combinar uno de estos aminoácidos con asparagina y/o glutamina resultó más eficiente la cisteína debido posiblemente a la disponibilidad del azufre de estos aminoácidos azufrados o bien, a la capacidad del microorganismo para utilizarlos.

Es posible, según estos resultados, que los dos aminoácidos azufrados estén siendo utilizados básicamente como fuente de azufre, con preferencia a la cisteína, y los dos aminoácidos amídicos como fuentes de carbono y nitrógeno.

Al definir los aminoácidos específicos que mejoraban tanto el crecimiento celular como la producción de zeaxantina, los resultados sugerían que el ion azufre podría ser un elemento importante en el metabolismo celular de la cepa. De esta manera, y con la finalidad de determinar la importancia del ion azufre, se evaluaron diferentes condiciones en donde se utilizaron cisteína y sulfato de magnesio en sus diferentes combinaciones posibles. Adicionando además asparagina como posible fuente de carbono y nitrógeno.

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la importancia del ion azufre. Se observa que el sulfato de magnesio por sí mismo mejora las respuestas en el crecimiento y producción de la cepa cuando se compara con las condiciones en que se utilizaron los dos aminoácidos individualmente (condiciones 4 y 8). En el caso de asparagina este efecto es más marcado ya que no existe una fuente alternativa de azufre.

Cuando se adiciona el sulfato al medio que contiene cisteína se observa un ligero incremento en el crecimiento de la cepa comparada con cisteína sola, no así en su producción. Lo que indica que el requerimiento de azufre está cubierto por cualquiera de las dos fuentes utilizadas, y que la cisteína muy posiblemente se utilice como fuente de este ión.

Lo anterior se corroboró cuando sulfato de magnesio se adicionó al medio que contiene asparagina (condición 9). En este caso se obtuvo un incremento significativo tanto en el crecimiento como en la producción del microorganismo, comparado tanto en la combinación cisteína-sulfato de magnesio (condiciones 5 a 7), como con asparagina

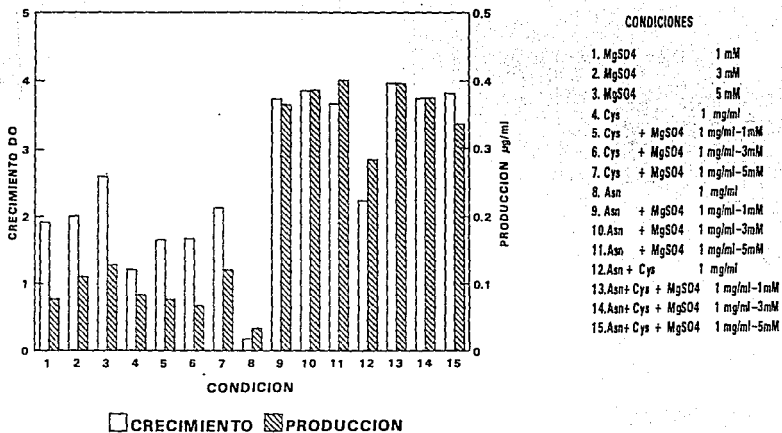


FIGURA 8. CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE *Flavobacterium* sp. EN DIFERENTES COMBINACIONES DE ASPARAGINA, CISTEINA Y SULFATO DE MAGNESIO.

sola (condición 8). Por lo que es de suponer que una vez cubiertas las necesidades de azufre, la cepa utiliza asparagina de una forma eficiente posiblemente como fuente de carbono y nitrógeno.

Dado que en todas las condiciones en las que estaba presente el ion azufre como sulfato de magnesio se mejoran las respuestas en el crecimiento del microorganismo, se planteó la pregunta de la importancia de el ion magnesio en el metabolismo de la cepa. Para ello se probaron diferentes sales: $MgSO_4$, $MgCl_2$, K_2SO_4 , Na_2SO_4 y $MnCl_2$ en diferentes combinaciones con la finalidad de comprobar si los dos elementos, azufre y magnesio, son importantes para los requerimientos nutricionales del microorganismo. En la figura 9 se observan los resultados de este experimento.

Como se observa en la gráfica, cuando se adiciona solamente magnesio, como $MgCl_2$, o sulfato, como K_2SO_4 , el microorganismo deja de crecer. Sin embargo cuando se combina la sal de magnesio, $MgCl_2$, con la sal de sulfato, K_2SO_4 o Na_2SO_4 , el microorganismo presenta respuestas en crecimiento y producción parecidas al control con $MgSO_4$. Se descarta así la posibilidad de que fuera por sí mismo el magnesio o bien el cloro el elemento nutricional importante para el microorganismo.

Del mismo modo cuando se combina la sal de sulfato, K_2SO_4 , con la sal de magnesio, $MgCl_2$, el microorganismo crece y produce como el control con $MgSO_4$. En cambio cuando al sulfato de potasio se le adiciona $MnCl_2$ el microorganismo deja de crecer. Se descarta así que sea únicamente el sulfato el elemento nutricional requerido por las células.

De esta manera se muestra que tanto el magnesio como el azufre son utilizados por el *Flavobacterium* sp. para cubrir sus requerimientos nutricionales, obteniéndose la siguiente formulación del medio químicamente definido:

COMPONENTE	CONCENTRACION
Glucosa	20.0 mg/ml
NaCl	3.0 %
K_2HPO_4	10.0 mM
$MgSO_4$	3.0 mM
El. Traza	0.1 %
Asparagina	1.0 mg/ml

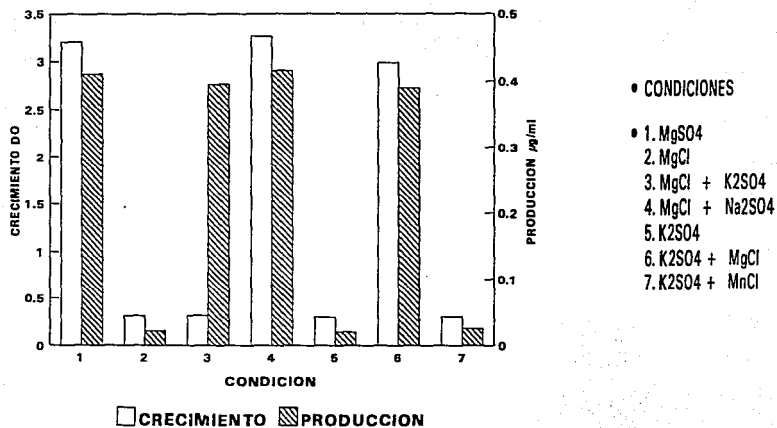


FIGURA 9. CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE *Flavobacterium* sp. EN DIFERENTES COMBINACIONES DE SALES (CADA SAL FUE ADICIONADA EN CONCENTRACIONES DE 3 mM).

2. EVALUACION DEL EFECTO DE LA CONCENTRACION DE DIFERENTES NUTRIMENTOS DEL MEDIO DE CULTIVO.

A. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ASPARAGINA.

Uno de los factores de importancia a determinar, en primera instancia, fue la concentración óptima de asparagina que permitiera las mejores respuestas en el crecimiento celular y producción de zeaxantina. A su vez, esto permitiría deducir algún posible efecto de regulación sobre la producción del pigmento por este aminoácido. Para ello se evaluaron diferentes concentraciones de asparagina en el medio mínimo obtenido y se observó su efecto sobre el crecimiento y producción de la cepa. Los resultados se presentan en la figura 10. Como se observa el incremento, tanto del crecimiento como de la producción, es paralelo al incremento de la concentración de asparagina, resultado que se corrobora al graficar la producción específica del pigmento. Es decir que asparagina, entre las concentraciones de 0.1 a 3 mg/ml, resultó ser un efector positivo de los parámetros antes indicados.

Al evaluar el consumo de glucosa del medio de cultivo se observó que el microorganismo al incrementar su crecimiento incrementó a su vez su consumo de glucosa, alcanzando un máximo de 13 mg/ml cuando la concentración del aminoácido fue de 3 mg/ml. Esto sugiere que el consumo de glucosa puede estar impedido por algún factor limitante del crecimiento celular. Ya que al parecer, si el microorganismo siguiera creciendo, consumiría mayor cantidad de glucosa.

Por lo que toca al amonio inorgánico, este fue consumido en su totalidad hasta una concentración de asparagina de 0.75 mg/ml. Ya que cuando la concentración del aminoácido fue de 1 mg/ml la cepa excretó amonio al medio de cultivo. Esto pudiera indicar que el catabolismo de la asparagina genera amonio como un subproducto del metabolismo celular. Por otro lado es interesante que el microorganismo tenga un mayor crecimiento cuando existe mayor concentración del aminoácido, lo que sugiere que éste es utilizado principalmente como fuente de carbono, más que como fuente de nitrógeno, aunque si bien eventualmente pueda ser utilizado como tal. Esto puede suponerse ya que al parecer, el microorganismo tiene cubierto su requerimiento de nitrógeno, lo que se refleja al estarlo excretando al medio de cultivo, luego entonces el nitrógeno del aminoácido no está siendo utilizado para fines de crecimiento, lo que apoya, por eliminación, que entonces es su cadena carbonada la que es utilizado para este fin.

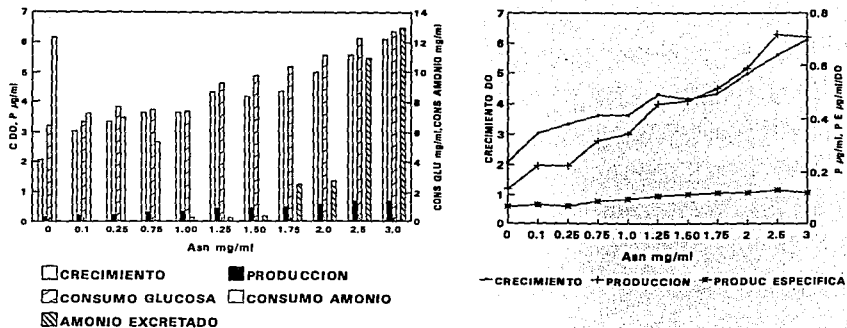


FIGURA 10. CRECIMIENTO, PRODUCCION, PRODUCCION ESPECIFICA, CONSUMO DE GLUCOSA, CONSUMO DE AMONIO Y AMONIO EXCRETADO DE *Flavobacterium* sp. EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ASPARAGINA (LAS CONCENTRACIONES UTILIZADAS DE GLUCOSA Y CLORURO DE AMONIO FUERON DE 2 % Y 20 mM RESPECTIVAMENTE).

B. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA.

Con la finalidad de determinar el efecto de diferentes concentraciones de glucosa sobre el crecimiento del microorganismo y la producción de zeaxantina y de esta manera determinar algún posible efecto regulatorio sobre la síntesis del pigmento por la fuente carbonada, se probaron diferentes concentraciones de glucosa en el medio de cultivo. Al mismo tiempo, se evaluó la posibilidad de eliminar el nitrógeno inorgánico del medio, para lo cual se probaron diferentes concentraciones de glucosa con amonio y sin amonio. En todas las condiciones se mantuvo la misma concentración de asparagina de 1 mg/ml. Cabe señalar que esta concentración fue elegida considerando que en ella el microorganismo presentó valores de crecimiento y producción adecuados para su determinación, dado el alto valor económico del mismo. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 11.

Como se puede observar en esta figura, en presencia de amonio inorgánico, las diferentes concentraciones de glucosa ejercen un efecto sobre el crecimiento y producción de la cepa que puede dividirse en dos fases. Una en la que, hasta concentraciones de 8 mg/ml, la glucosa es un efector positivo tanto de la síntesis del pigmento como del crecimiento del microorganismo, alcanzando en este punto los máximos niveles de estos parámetros. Después, en la segunda fase, a mayores concentraciones de glucosa el microorganismo mantiene sus niveles de crecimiento, no así los de producción que empiezan a disminuir gradualmente. Encontrándose los valores más bajos en concentraciones de 80 y 100 mg/ml. Por otro lado, a concentraciones de glucosa mayores de 10 mg/ml, la cepa consume proporcionalmente menor cantidad del carbohidrato. Alcanzando un valor máximo de consumo de 38 mg/ml cuando la concentración de glucosa fue de 100 mg/ml.

Al eliminar el amonio inorgánico del medio de cultivo, se observó que existe un incremento tanto del crecimiento celular como de la producción de pigmento. Este resultado fue repetitivo en los experimentos, ya que siempre que se disminuyó la cantidad de amonio del medio se mejoró el crecimiento celular.

El efecto de la glucosa sobre la producción de zeaxantina se presenta mejor definido cuando se elimina el amonio inorgánico del medio de cultivo. Nuevamente tanto el crecimiento celular como la producción de zeaxantina alcanzan su valor máximo en 8 mg/ml de glucosa. Tanto la producción del pigmento como el crecimiento del *Flavobacterium* empiezan a disminuir gradualmente hasta en un 40 % en concentraciones de glucosa entre 80 y 100 mg/ml. También en este caso, a

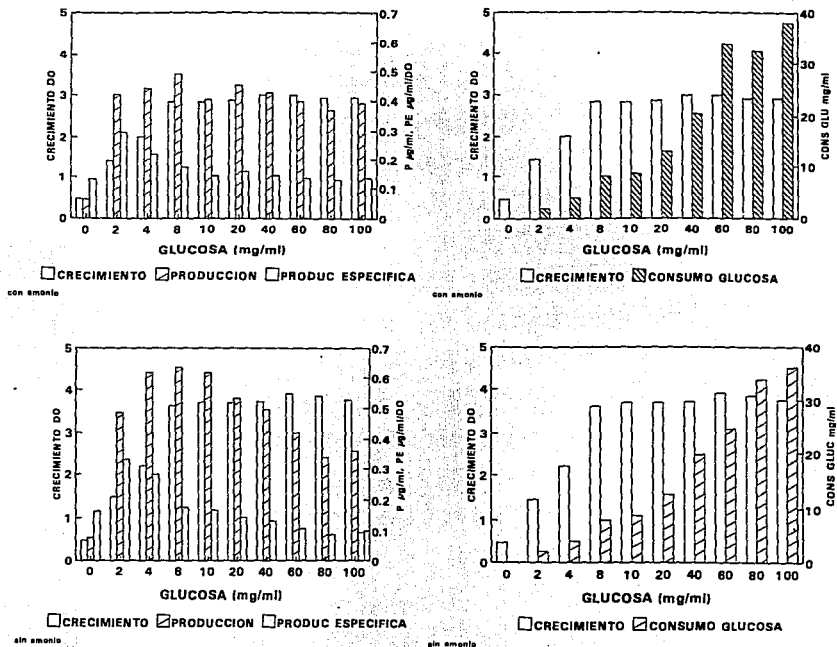


FIGURA 11. CRECIMIENTO, PRODUCCION, PRODUCCION ESPECIFICA Y CONSUMO DE GLUCOSA DE *Flavobacterium* sp. EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA CON Y SIN ADICION DE CLORURO DE AMONIO (20 mM).

concentraciones de glucosa mayores a 10 mg/ml, la cepa consume proporcionalmente menor cantidad del carbohidrato, alcanzando un valor máximo de 36 mg/ml cuando la concentración de glucosa fue de 100 mg/ml.

C. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AMONIO INORGANICO.

Para determinar el efecto que la concentración del amonio inorgánico tiene sobre el crecimiento celular y la producción de zeaxantina, se evaluaron diferentes concentraciones de amonio. Para ello se mantuvo la concentración de asparagina en 1 mg/ml. Estos resultados se presentan en la figura 12.

Se observa que a mayores concentraciones de amonio inorgánico el microorganismo es afectado en su crecimiento y en su producción. Como se ha notado, siempre que se disminuyó la cantidad de amonio del medio de cultivo el crecimiento del microorganismo fue favorecido.

Por otro lado también se observa que a mayores concentraciones de este ion, la cepa excreta cantidades mayores de amonio al medio de cultivo. Es decir que este microorganismo en las condiciones de cultivo evaluadas encuentra cantidades de amonio excesivas para su metabolismo celular y tiende por ello a excretarlo al medio.

D. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FOSFATO.

El efecto de la concentración de fosfato sobre el crecimiento celular y la producción de zeaxantina, fue evaluado adicionando diferentes concentraciones de fosfato al medio de cultivo. En la figura 13 se presentan los resultados obtenidos de esta evaluación.

Se encontró que el fosfato en concentraciones de 1 a 100 mM, el microorganismo incrementa gradual y ligeramente su crecimiento y producción hasta alcanzar su nivel máximo en los niveles de 50 mM de fosfato. Posteriormente tanto el crecimiento como la producción disminuyen ligeramente, encontrándose su valor más bajo en una concentración de 100 mM. El consumo de fosfato inorgánico se incrementa gradualmente a mayores concentraciones de fosfato.

2. UTILIZACION DE ASPÁRAGINA (METABOLISMO).

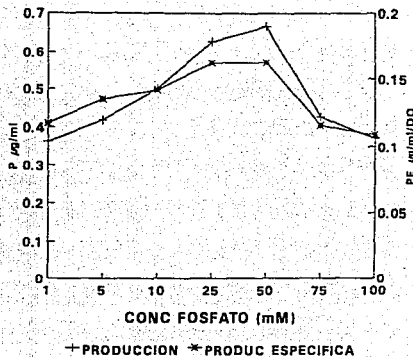
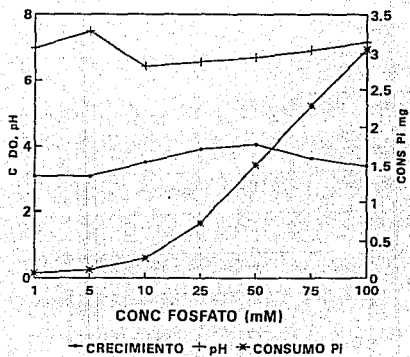


FIGURA 13. CRECIMIENTO, PRODUCCION, PRODUCCION ESPECIFICA, CONSUMO DE FOSFATO Y pH DE *Flavobacterium* sp. EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FOSFATO, K_2HPO_4 (SE ADICIONARON 1 mg/ml DE ASPARAGINA Y 2 % DE GLUCOSA)

El microorganismo, en presencia de glucosa, es capaz de utilizar eficientemente asparagina para su crecimiento y producción de pigmento. Como antes se ha indicado es muy posible que la cepa esté utilizando a este aminoácido principalmente como fuente de carbono y eventualmente de nitrógeno.

Para tratar de discernir la forma en que este aminoácido es utilizado por el *Flavobacterium* sp. se probaron diferentes intermediarios del ciclo de Krebs y de la glucólisis. Se decidió utilizar aún a la glucosa ya que su combinación con asparagina mejora el crecimiento celular y la producción de zeaxantina. Los resultados se presentan en la figura 14.

Se puede observar lo siguiente:

a. Al comparar las condiciones 0 y 8, donde la diferencia es la fuente de nitrógeno adicionada al medio de cultivo, se observa que cuando se utiliza cloruro de amonio como fuente de nitrógeno, tanto el crecimiento como la producción disminuyen. Lo que indica que el aminoácido es mejor fuente de nitrógeno.

b. Al adicionar intermediarios del ciclo de Krebs (citrato, oxalacetato, α -cetoglutarato, malato) a la condición de asparagina y glucosa, en todos los casos la producción se estimula, no así el crecimiento que se mantuvo sin variación considerable. Al parecer la fuente adicional de carbono sirve para incrementar la producción de pigmento.

c. Al adicionar los intermediarios de la glucólisis (glucosa-6-fosfato, fructosa-1,6-difosfato) y el producto de esta, el piruvato, a glucosa y asparagina, sólo el piruvato mejoró considerablemente la producción, no así el crecimiento que cambió mínimamente. Nuevamente al parecer la fuente adicional de carbono en forma de piruvato fue utilizada para la producción del pigmento. Cuando se adicionaron glucosa-6-fosfato y fructosa-1,6-difosfato, tanto el crecimiento como la producción se vieron ligeramente disminuidos respecto al control. Esto posiblemente se debió a problemas relacionados con la asimilación de los intermediarios.

d. Cuando se eliminó el aminoácido del medio de cultivo, comparando las condiciones 8 vs 9, 11, 12 y 13, se observó que al adicionar intermediarios del ciclo de Krebs a la glucosa y al cloruro de amonio, tanto el crecimiento como la producción se vieron considerablemente favorecidos. Se concluyó así, que el aminoácido puede ser sustituido por cualquiera de estos intermediarios, lo que apoyó la hipótesis de que el aminoácido se incorpora al ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Cabe señalar que no obstante los resultados obtenidos de este experimento, no se logra discernir con

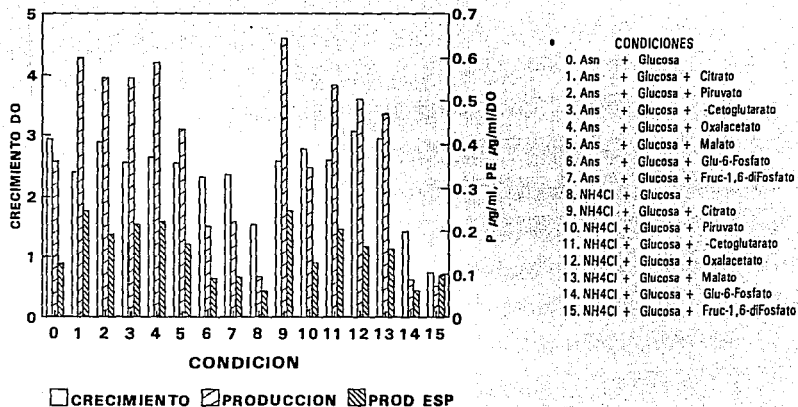


FIGURA 14. CRECIMIENTO, PRODUCCION Y PRODUCCION ESPECIFICA DE *Flavobacterium* sp. EN DIFERENTES CONDICIONES, UTILIZANDO INTERMEDIARIOS DE LA -- GLUCOLISIS Y DEL CICLO DE KREBS (Asn, 1 mg/ml; GLUCOSA, 1 %; IN-- TERMEDIARIOS, 10 mM).

precisión la forma en que la asparagina se metaboliza y la idea de que pudlèse ser a través de formar oxalacetato sigue siendo una de las posibilidades.

e. Al adicionar los intermediarios de glucólisis a la glucosa y al disminuir el crecimiento de la cepa. Se consideró nuevamente que estos compuestos pudieran no ser asimilados por el microorganismo. Por otro lado, cuando se adicionó el piruvato, a la glucosa y al cloruro de amonio, nuevamente se observó un incremento considerable en el crecimiento celular y la producción de pigmento.

Estos resultados muestran que el *Flavobacterium* sp. tiene la característica de utilizar como fuente de carbono a los intermediarios del ciclo de Krebs o bien al piruvato, el producto final de la glucólisis. Sin embargo, los experimentos hasta aquí realizados no permiten determinar si el microorganismo puede utilizar algún intermediario de la glucólisis.

3. EVALUACION DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO EN UN MEDIO SIN ASPARAGINA.

Dado que los resultados mostraban que la asparagina podía ser sustituida por el piruvato o bien por algún intermediario del ciclo de Krebs sin que se afectara el crecimiento y la producción de la bacteria, quedaba por último evaluar la posibilidad de eliminar a la glucosa que aún fue añadida a los medios provados. Como se ha mencionado la glucosa mejora las respuestas en crecimiento y producción cuando el microorganismo es crecido en aminoácidos.

Para ello se probaron diferentes carbohidratos sin adicionar glucosa: acetato de sodio, succinato de sodio y piruvato de sodio, sacarosa, glucosa (inclusive) y xilosa; utilizando como control la combinación de glucosa-citrato 55-10 mM. La concentración utilizada de cada carbohidrato fue de 55 mM ya que en experimentos previos donde se utilizaron concentraciones de 10 mM el microorganismo fue incapaz de crecer. Los resultados se presentan en la figura 15.

Se observa en la gráfica que el citrato, el succinato y el piruvato permiten alcanzar las mejores respuestas tanto en el crecimiento celular como en la producción de pigmento, alcanzando niveles parecidos a la combinación citrato-glucosa y sin existir una diferencia importante entre ellos. Por su parte tanto la glucosa como la sacarosa presentan respuestas intermedias, mientras que xilosa presenta los valores más bajos. Es posible señalar que bajo estas condiciones de cultivo, el microorganismo tiene la capacidad de utilizar como fuente de carbono preferentemente al piruvato o bien a los

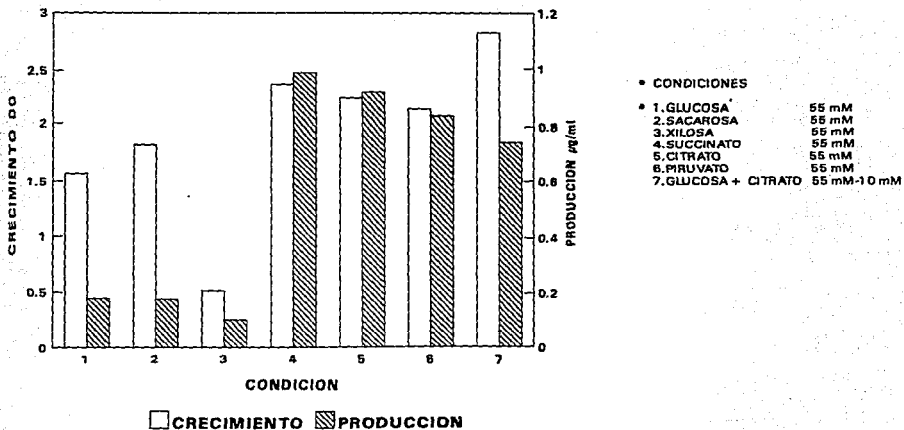


FIGURA 15. CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE *Flavobacterium* sp. EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

intermediarios del ciclo de Krebs y que si bien es capaz de utilizar a la glucosa y a la sacarosa, estas no le permiten crecer a los mismos niveles alcanzados por los primeros. Los experimentos hasta aqui realizados no permiten conocer cual es el paso limitante en la utilización de la glucosa y sólo muestran que este carbohidrato mejora las respuestas de crecimiento y producción cuando se utilizan aminoácidos en el medio de cultivo. Finalmente el medio químicamente definido presenta la siguiente formulación:

COMPONENTE	CONCENTRACION
Citrato	55.0 mM
NaCl	3.0 %
K ₂ HPO ₄	10.0 mM
MgSO ₄	3.0 mM
NH ₄ Cl	20.0 mM
EL. TRAZA	0.1 %

VI. CONCLUSIONES

1.-El *Flavobacterium* sp. presenta la característica de utilizar aminoácidos, la asparagina o la glutamina, como fuente de carbono y nitrógeno.

1.1 Es determinante para ello que estén presentes los iones azufre y magnesio.

1.2 Las respuestas en el crecimiento celular y la producción de zeaxantina se ven mejoradas cuando se adiciona glucosa al medio de cultivo

2. La glucosa en concentraciones de 80 mg/ml ejerce un efecto negativo sobre la síntesis del pigmento. La concentración óptima de este carbohidrato para la producción de zeaxantina es de 8 mg/ml.

3. No se observa ningún efecto sobre la síntesis de zeaxantina en las concentraciones evaluadas de amonio, fosfato y asparagina.

4. Es muy probable que la asparagina se utilice principalmente como fuente de carbono incorporándose al ciclo de Krebs en forma de oxalacetato. Eventualmente se utiliza como fuente de nitrógeno cuando no se adiciona una fuente alternativa del mismo.

5. Los intermediarios del ciclo de Krebs, así como el producto final de la glucólisis, el piruvato, permiten igualar los valores obtenidos en crecimiento celular y producción de zeaxantina al utilizar asparagina-glucosa.

5.1 Por consiguiente, el piruvato o los ácidos tricarbóxicos en una concentración de 10 mM, en presencia de glucosa, pueden sustituir a la asparagina del medio de cultivo.

6. El succinato, el citrato y el piruvato a concentraciones de 55 mM permiten alcanzar respuestas similares en crecimiento celular y producción de pigmento al utilizar una combinación de glucosa-citrato 55mM-10mM.

6.1 Es factible eliminar a la glucosa del medio de cultivo y contar así con una sola fuente de carbono en la formulación del medio mínimo.

BIBLIOGRAFIA

Badul, DS. (1981). *Pigmentos. En Química de Alimentos*. Ed. Alhambra. México. pp. 223-245.

Barua, KR; Barua, AB. (1966). *Oxidation of zeaxantin*. *Biochem. J.* 101: 250-255.

Breed, R; Murroy, E and Smith, N. (1957). *Genus III. Flavobacterium*. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 7th Ed. The Williams and Wilkins Co. pp. 309-322.

Bertram, SJ; Kolonel, NL, Meyskens, LF. (1987). *Rationale and strategies for chemoprevention of cancer in Humans*. *Cancer Research* 47: 3012-3031

Bramley, JK; Mackenzie, JK. (1992). *Carotenoid biosynthesis and its regulation in fungi*. In *Handbook of Applied Mycology*. Vol. 4. Eds. Arora D., Elander R. and Mukerji K. Marcel Dekker, New York. pp. 401-444.

Britton, G. and Goodwin, TW. (1971). *Biosynthesis of carotenoids In Methods in Enzymology XVIII*. 654-701.

Britton, G. (1985). *General Carotenoids Methods. In Methods in Enzymology*. III: 113-149.

Chichester, CO; Yokoyama, H; Nakayama, TO; Lutkon, A; Mackinney, G. (1959). *Leucine metabolism and carotene biosynthesis*. *J. Biol. Chem.* 234: 598-602.

Cutler, GR. (1984). *Carotenoids and retinol their possible importance in determining longevity of primate species*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 7627-7631.

Dandekar, S and Modi, VV. (1982). *Involvement of cyclic AMP in carotenogenesis and cell differentiation in Blakeslea trispora*. *Biochim. Biophys. Acta* 628: 398-406.

Dasek, J; Sheperd, D et Traelnes RK. (1973). *Procédé de production de zéaxanthine*. Patente 790289. Belgique.

Dholakia, JN and Modi, VV. (1982). *Fermentative production of β -carotene and extracellular β -glucosidase by Blakeslea trispora grown on cellobiose*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech. 15: 33-35.

Dholakia, JN and Modi, VV. (1984). *Regulation of carotenogenesis by inorganic phosphate in Blakeslea trispora*. J. Gen. Microbiol. 130: 2043-2049.

Diversé-Pierluissi M and Krogmann, DW. (1988). *A zeaxanthin protein from Anacyctis nidulans*. Biochim. and Biophys. Acta. 933: 372-377.

Erdam, JW; Christopher, LP and Dietz, MJ. (1988). *Factors affecting the bioavailability of vitamin A, carotenoids and vitamin E*. Food Technol. 21: 216-221.

Goodwin, TW. (1959). *Biosynthesis and function of carotenoids pigments*. Adv. Enzymology. 21: 295-336.

Goodwin, TW. (1971). *Carotenoid biosynthesis. En: Carotenoids*. Ed. Otto Isler. Birkhauser Verlag Basel. pp. 578-599.

IUPAC and IUPAC-IUB. (1971). *Tentative rules for the nomenclature of carotenoids*. Nature. 10(26): 4827-4837.

Jhonson, AE and Lewis, SM. (1979). *Astaxanthin formation by the yeast Phaffia rhodozyma*. J. Gen. Microbiol. 115: 173-183.

Kaplan, L; Lau, J. and Stein, E. (1990). *Carotenoid composition, concentrations and relationships in various human organs*. Clin. Physiol. Biochem. 8: 1-10.

Krisnky, IN. (1987). *Overview of carotenoids in medicine. 8th. International Symposium on Carotenoids*. Boston Massachusetts. USA. Jul. 27-31. P42A.

- Lehninger, LA. (1981). *Biosíntesis de lípidos. En Bioquímica*. Ed. Omega. Barcelona. pp. 671-702.
- McDermott, C; Britton, G and Goodwin, W. (1973)a. *Effect of inhibitors on zeaxanthin synthesis in a Flavobacterium*. J. Gen. Microbiol. 77: 161-171.
- McDermott, C; Britton, G and Goodwin, W. (1973)b. *Carotenoids biosynthesis in a Flavobacterium sp: stereochemistry of hydrogen elimination in desaturation of phytoene to lycopene, rubixanthin and zeaxanthin*. Biochem. J. 134: 1115-1117.
- McDermott, C; Brown, J and Britton, G. (1974). *Alternative pathways of zeaxanthin biosynthesis in a Flavobacterium species*. Biochem. J. 144:231-243.
- Nelis, JH and De Leenheer, PA. (1989). *Microbial production of carotenoids other than β -carotene. In Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors*. Elsevier Applied Science. New York. pp. 43-80.
- Neatherburn, WM. (1967). *Phenol hypochlorite reaction for determination of ammonia*. Anal. Chem. 39: 871-974.
- Nelis, JH; De Leenheer, PA. (1991). *Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds*. J. App. Bacteriol. 70: 181-191.
- Ninet L; Renaut, J. (1979). *Carotenoids. In Microbial technology*. 2d. Ed. vol.1. Ed. Pepper, HJ and Perlman, D. New York: Academic Press. pp. 529-544.
- Noonan, J and Meggos, H. (1980). *Synthetic food colours. In Handbook of food additives*. Ed. CRC. pp. 339-383.
- Noonan, J. (1980). *Color additives in food. En Handbook of food additives*. Ed. CRC. pp. 587-615.
- Orange, WMF and Monclair, BT. (1961). *Microbiological production of carotenoids*. United States Patent Office. Patent Number 2974044.

Perry, LK; Simonitch, AT; Harrison-Lavoie, JK and Liu S-T. (1986). *Cloning and regulation of Erwinia herbicola pigment genes*. J. Bacteriol. 168: 607-612

Ruddat, M and Garber, ED. (1983). *Biochemistry, physiology and genetics of carotenogenesis in fungi. In Secondary metabolism and differentiation in fungi*. Ed. Bennett, SH and Ciegler, A. Marcel Dekker Inc. New York. pp. 95-155.

Rosas, R. (1993). *Efecto de diversas fuentes de carbono sobre la síntesis de carotenoides en el hongo Dacrymyces deliquescens*. Tesis de Maestría. UNAM.

Skromne, I y Sánchez, S. (1991). *Mutagénesis con Tn5 para la obtención de una cepa sobreproductora de carotenoides*. Trabajo presentado en el 50 aniversario del IIB. UNAM.

Schwartz, R; Rosas, R; Farrés, A; Paredes, L y Sánchez, S. (1989). *Producción microbiana de carotenoides y perspectivas de su utilización*. Boletín de Educación Bioquímica.

Shoeher, A et Wis, O. (1972). *Procédé pour la preparation de zeaxanthine*. Patente 770744. Bélgica.

Sheperd, D et Dasek, J. (1974). *Procédé de preparation de zeaxanthine*. Patente 816876. Bélgica.

Shepherd, D; Dasek, J et Carels, M. (1974). *Procédé de production de zeaxanthine*. Patente 816767. Bélgica.

Sherman, F; Fink, RG and Lawrence, WC. (1971). *Methods in yeast genetics*. Laboratory Manual. Cold Spring Harbor. New York. pp. 1-6.

Stich, F; Stich, W; Rosin, P and Vallejera, O. (1984). *Use of the micronucleus test to monitor the effect of vitamin A, β -carotene and canthaxanthin on the buccal mucosa of betel nut/lobbaco chewers*. Int. J. Cancer. 34: 745-750.

Summer, B. (1944). *Determination of inorganic phosphate*. Science. 100: 413.

Weeks, B and Andrewes, G. (1969). *Occurrence of C40 and C45 carotenoids in the C50 carotenoid system of Flavobacterium dehydrogenans*. Arch. Biochem. Biophys. 123:45-57.

Weeks, B and Garner, J. (1967). *Biosynthesis of carotenoids in Flavobacterium dehydrogenans*. Arch. Biochem. Biophys. 121: 35-49.

Will, H and Scovel, A. (1987). *Photoprotective functions of carotenoids*. 8th. international Symposium on carotenoids. Boston Massachusetts, USA. Jul. 27-31. 27A.