

Otro uso importante de los hongos

Other important use of mushrooms

Catalina Rosales-López¹

Fecha de recepción: 6 de marzo de 2018

Fecha de aprobación: 7 de setiembre de 2018

Rosales-López, C. Otro uso importante de los hongos. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-2. Abril-Junio 2019. Pág 82-90.

DOI: <https://doi.org/10.18845/tm.v32i2.4351>

¹ Profesor-Investigador, Escuela de Biología, Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: crosales@tec.ac.cr.



Palabras clave

Hongos; usos medicinales; pigmentos.

Resumen

A los hongos se le atribuyen muchos beneficios sobre la salud humana, tal como a las plantas medicinales. No todos son venenosos o comestibles, existen otros usos importantes. En este artículo se resalta la propiedad que tienen los hongos para obtener pigmentos naturales. Los colorantes obtenidos de microorganismos cuentan con la ventaja de ser pigmentos con tonalidades específicas, sin efectos nocivos para la salud y con múltiples beneficios económicos a nivel industrial. Esta investigación tuvo como objetivo la obtención de pigmentos naturales (carotenoides específicamente) para su uso en animales a partir de dos hongos: *Pycnoporus sanguineus* y *Rhodotorula spp.* *P. sanguineus* se encuentra como cuerpos fructíferos de color rojo-anaranjado, ha sido estudiado principalmente para degradar lignina y celulosa de la madera y por la producción de cinabarina (antibiótico). En el caso de *Rhodotorula spp* es una levadura, sus colonias se caracterizan por ser de color anaranjado brillante, ha sido muy estudiada por la presencia de carotenoides. En el laboratorio, se aislaron y purificaron en medio sólido, se realizaron pruebas de medios líquidos que favorecieran su crecimiento y producción del colorante y se realizó el escalamiento para la mayor obtención de biomasa y por ende, del pigmento. Los hongos fueron liofilizados, se realizó una ruptura células con nitrógeno líquido y se tamizó, obtenido un polvo fino que se les suministró a los animales como parte de su dieta, con quienes se logró aumentar la coloración de la yema del huevo, de 12 a 14 de tonalidad, según el abanico de color amarillo.

Keywords

Mushrooms; medicinal uses; pigments.

Abstract

The fungi are attributed many benefits on human health, such as medicinal plants. Not all are poisonous or edible, there are other important uses. In this article, the property of fungi to obtain natural pigments is highlighted. The dyes obtained from microorganisms have the advantage of being pigments with specific shades, without harmful effects for health and with multiple economic benefits at an industrial level. This research aimed to obtain natural pigments (carotenoids specifically) for use in animals from two fungi: *Pycnoporus sanguineus* and *Rhodotorula spp.* *P. sanguineus* is found as red-orange fruiting bodies, it has been studied mainly to degrade lignin and wood cellulose and for the production of cinnabarin (antibiotic). In the case of *Rhodotorula spp* is a yeast, its colonies are characterized by being bright orange, has been studied for the presence of carotenoids. In the laboratory, they were isolated and purified on solid media, liquid media tests were carried out that favored their growth and production of the dye, and scaling was carried out to obtain the highest biomass and, therefore, the pigment. The fungi were lyophilized, cells were ruptured with liquid nitrogen and sieved, obtaining a fine powder that was given to the animals as part of their diet, with which it was possible to increase the egg yolk coloration, from 12 to 14 of tonality, according to the yellow fan.

Introducción

El reino Fungi representa uno de los más grandes acervos de biodiversidad con actividades biológicas, dada la gran diversidad que abarca (setas, levaduras, mohos, entre otros). Algunos

hongos son muy grandes pero otros son tan pequeños que sólo pueden verse utilizando un microscopio. Entre los organismos incluidos en la categoría de hongos se pueden describir, en su mayoría, como filamentosos con crecimiento apical, eucarióticos, heterótrofos por absorción, con reproducción asexual y sexual por medio de esporas, y con pared celular principalmente constituida por quitina o celulosa [1]. Se estiman alrededor de 140 000 hongos en la tierra y solo se conocen los usos del 10% de ellos, entre los cuales se encuentran los champiñones (hongos comestibles) que son solo el 5%, lo que implica que son 7000 todavía las especies no descubiertas que podrían tener un posible beneficio para la humanidad [2] y [3].

Su importancia es innegable en muchas áreas, tanto para el ser humano como para el medio ambiente en general. Durante milenios, los hongos han sido valorados por la humanidad como un recurso comestible y médico. Su consumo es sumamente popular en la gastronomía de ciertas regiones; quizá los champiñones y setas son los hongos más consumidos. En cuanto a lo medicinal, se han identificado varias moléculas bioactivas, incluidas sustancias antitumorales, en muchas especies de hongos [4], [5], [6], y [7]. Los polisacáridos son las sustancias derivadas de las setas más conocidas y más potentes con propiedades antitumorales e inmunomoduladoras [8] y [9].

Otras actividades que se le atribuyen a los hongos están: antimicrobianos [10]. Efecto antiviral [11]. Manejo de plagas como fitopatógenos, [12] y [13]. Bioantagonistas como *Paenibacillus lentimorbus*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma polysporum*, pueden controlar el fitopatógeno *Rhizoctonia solani* [14].

Y el atributo que se desea resaltar en esta publicación es, como proveedores de pigmentos naturales (sustancias coloridas sintetizadas, acumuladas o excretadas a partir de células), que pueden ser empleados para colorear alimentos, en la industria farmacéutica y textil. Estos colorantes cuentan con la ventaja de que pueden ser de tonalidades específicas, sin efectos nocivos para la salud y con múltiples beneficios económicos a nivel industrial, desplazando a los pigmentos sintetizados químicamente, que presentan desventajas toxicológicas [15].

Los hongos filamentosos son los microorganismos más importantes y estudiados en la obtención de pigmentos naturales, en especial los géneros *Monascus spp* (reconocidos por producir monacolina, pigmentos amarillos, anaranjados y rojos), *Paecilomyces spp.*, *Aspergillus spp* y *Penicillium spp*. Pero además de los hongos filamentosos, también las levaduras son utilizadas para producir pigmentos rojos de importancia en alimentos.

Con esta investigación se extrajeron los pigmentos naranjas de un hongo filamentoso *Pycnoporus sanguineus* y una levadura: *Rodotorula sp*.

Materiales y métodos

Esta metodología se desarrolló en los laboratorios del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, como parte de un proyecto de investigación, en conjunto con la empresa Laboratorios Gaher S.A., y con quienes se está tramitando el licenciamiento del proceso de producción, razón por la cual las metodologías y resultados presentados son muy limitados.

Aislamiento y purificación

Tanto la levadura como el cuerpo fructífero se introdujeron en medio sólido por medio de técnicas biotecnológicas. Se aisló y purificó el microorganismo realizando varios subcultivos en medio estéril nuevo. Una vez puro, se realizó prueba de medios de cultivo (sintéticos y de bajo costo) para determinar en cuál de ellos aparece mayor pigmento.

Establecimiento en medio líquido

Se realizó una prueba de medios líquidos para determinar en cuál de ellos se producía mayor coloración. Los microorganismos puros se pusieron a crecer en Erlenmeyer de 250ml durante 4 días. Una vez optimizadas las condiciones de cultivo se realizó escalamiento en Biorreactores de 10L.

Obtención de colorantes

Se separa el microorganismo del medio de cultivo para poder recuperar el pigmento, para ello se utilizaron técnicas sencillas de extracción y disrupción celular. Se realizó una identificación y cuantificación de los carotenoides presentes.

Prueba de efectividad del colorante

Esta metodología se realizó con la ayuda de los veterinarios de Laboratorios Gaher S.A. Se compraron diez codornices hembras y un macho, de coloración negra, rompiendo postura (estado fisiológico) y en condiciones óptimas de salud. Las 10 codornices se dividieron en dos grupos, uno control y otro al que se le proporcionó el extracto de hongos.

Primero se les definió una dieta común, dieta *El Campesino* para ponedoras (producto comercial), durante una semana hasta su adaptación. Durante la primera producción de huevos se analizaron la coloración inicial de las yemas. La coloración de la yema se comparó con un abanico de colores de la yema de huevo de aves, Basf®-Alemana, con un gradiente de tonos de amarillo que van desde amarillo pálido (color paja) hasta un amarillo naranja-rojo intenso, con gradiente numérico de 1 a 15 respectivamente (Figura 3). Seguido, se decidió reducir la coloración de la yema, para determinar el aumento de color, para ello se les sometió a una dieta empírica, donde se suprimió de carotenos. Para finalmente, suministrar una tercera dieta incluyendo el extracto de hongos a una concentración de 100mg/kg.

Se realizaron pruebas sensoriales para determinar alguna variación en el sabor del huevo, color de la cáscara y brillantez de la membrana de la yema.

Resultados y discusión

Los hongos constituyen una fuente abundante de bioproductos que abarca enzimas, ácidos orgánicos, extractos proteicos, vitaminas y metabolitos secundarios. La producción de pigmentos naturales con el empleo de microorganismos y en particular, hongos, recientemente ha tomado gran auge. La variedad de metabolitos secundarios producidos por los hongos podría deberse a su incapacidad de sintetizar macromoléculas a partir de dióxido de carbono o de energía lumínica ya que no contienen clorofila, por lo tanto, su supervivencia depende de las condiciones ambientales y del sustrato donde se desarrollan [16]. Razón por lo cual, fue para nosotros importante, primero optimizar las condiciones de crecimiento y producción del pigmento, cumpliendo con lo exigido por los hongos, hasta lograr un cambio o alteración en su metabolismo, para originar gran cantidad de los compuestos de interés.

La principal característica de *Pycnoporus sanguineus*, es su coloración naranja fuerte, tanto en el cuerpo fructífero como el micelio *in vitro* (Figura 1), razón por la cual fue de interés para este proyecto. *Pycnoporus* es un hongo filamentoso perteneciente a los basidiomicetos, el cual ha sido estudiado principalmente por su capacidad para degradar lignina. Se encuentra ampliamente distribuido, creciendo de manera silvestre en ambientes tropicales y subtropicales, sobre sustratos tan diversos como troncos de encino, eucalipto, caucho, palma de aceite, e incluso sobre troncos quemados [17]. También se ha reportado su interés como colorante [18].

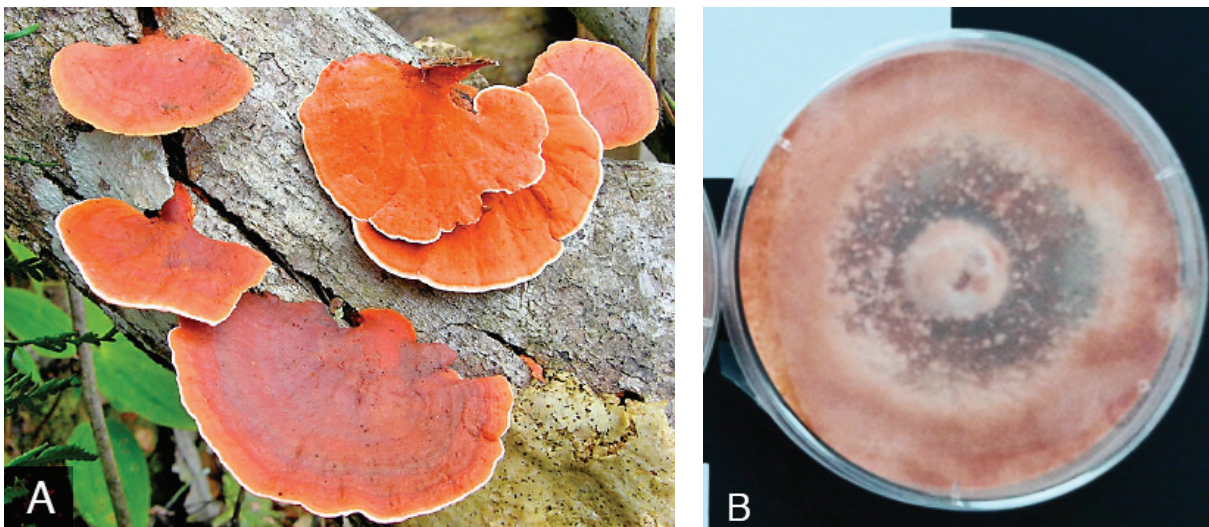


Figura 1. Hongo *Pycnoporus sanguineus*: A) Cuerpos fructíferos en el campo (fuente: <https://www.naturalista.mx/taxa/179081-Pycnoporus-sanguineus>) y B) Hongo cultivado *in vitro* en el laboratorio CIB

Por otro lado, el género *Rhodotorula* ya ha sido estudiado por la presencia de carotenoides, principalmente las variedades *R. glutinis* y *R. mucilaginosa*. *Rhodotorula* es una levadura roja oleaginosa que puede acumular tanto lípidos como β -caroteno como principales carotenoides [19]. A ella se le atribuyen varias acciones biológicas importantes como provitamina A, antioxidante, actividades anticancerígenas e inmunomodulación [20]. Las variedades analizadas en este estudio fueron *Rhodotorula. sp* y *R. rubra*, quienes presentaron un crecimiento en placa distinto, pero de coloración característica del género. En el caso de *R. rubra*, sus colonias eran de mayor tamaño y la tonalidad del naranja más fuerte a diferencia del *Rhodotorula sp*, quien presentaba tonalidades de naranja más claras (figura 2).

Las coloraciones se deben al grupo de carotenoides presentes. Los carotenoides son pigmentos orgánicos liposolubles formados a partir de unidades de isopreno, principalmente de 40 carbonos, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (plantas, microalgas, bacterias, levaduras y hongos). Hasta el momento se reportan más de 600 carotenoides conocidos, que involucran diversas funciones tales como precursores de vitamina A, agentes antioxidantes, pigmentos fotosintéticos y de alimentos, atrayentes visuales en el cortejo entre animales o bien, en procesos de polinización entre insectos y flores [21] y [22]

Como se observa en las figuras 1 y 2, los colorantes naturales obtenidos a partir de los microorganismos analizados, se producen paralelo al crecimiento de biomasa del mismo. Este tipo de pigmentos son sustancias coloridas sintetizadas, acumuladas en las células, la cuales pueden ser empleadas para colorear los alimentos, evitando las desventajas toxicológicas de los pigmentos sintetizados químicamente.

Esta nueva forma de producción de colorantes a partir de microorganismos, se obtiene gracias a la presencia de metabolitos secundarios con tonalidades específicas, sin efectos nocivos para la salud y con múltiples ventajas económicas a nivel industrial [23]. En el continente asiático, no sólo se utilizan para colorear alimentos, sino también en la industria farmacéutica y textil, como conservadores de carne y pescado, como agentes de sabor debido a sus aromas y sabores especiales, y en la producción de vino de arroz rojo[24].

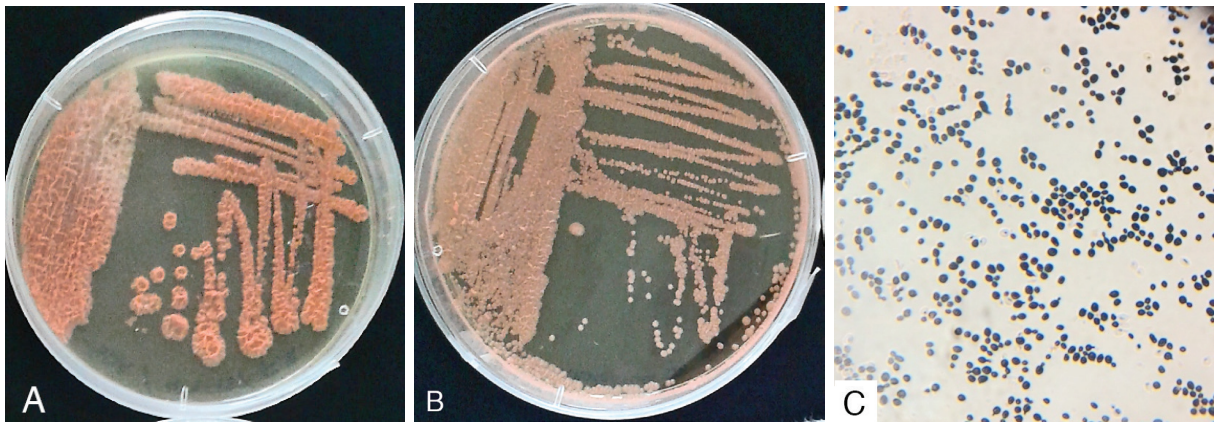


Figura 2. Levadura *Rhodotorula* crecida en medio sólido A) *Rhodotorula rubra* y B) *Rhodotorula* sp y la identificación de ambas al microscopio

En cuanto a la prueba de efectividad de los pigmentos naturales obtenidos, se puede decir que la dieta común suministrada para ponedoras (producto comercial), permitió la producción de huevos por parte de todas las codornices. Al analizar la coloración de las yemas con el abanico de colores de yema de huevo de aves, Basf-Alemana (figura 3), se determinó que las yemas obtenidas por las codornices sin suministrar el extracto se encuentran dentro del gradiente 12 (aunque la sombra en la foto no ayuda mucho a ver la debilidad del color).



Figura 3. Abanico de colores para yema de huevo de aves, marca Basf®-Alemana

Al variar la dieta, a un alimento sin xantinas (carotenoides) se observó una disminución en la tonalidad de la yema (figura 4, D), así como un aumento gradual en la coloración al suministrarles *Rhodotorula* y *Pycnoporus* (figura 4, C y E, respectivamente).

Con los resultados anteriores, se puede observar como al suministrar los extractos de hongos, el tono de la coloración de la yema aumentó efectivamente, logrando obtener yemas con una tonalidad hasta 14, según la marca Basf®-Alemana.

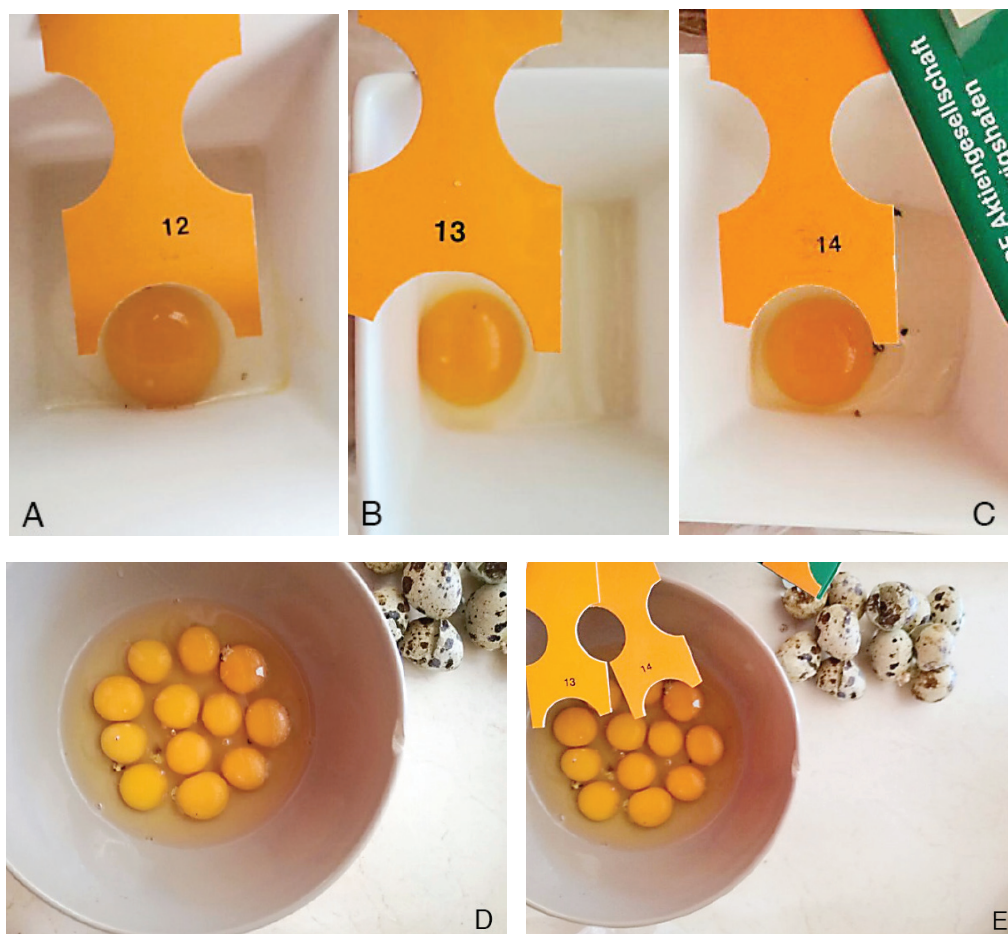


Figura 4. Prueba de coloración de la yema de huevo. A) Coloración de la yema de huevo, proporcionándoles a las codornices una dieta comercial. B) Coloración de la yema de huevo gracias al extracto de *Pycnoporus sanguineus*, C) Coloración de la yema de huevo proporcionándoles a las codornices extracto de *Rhodotorula*. D) Yemas de huevo con una dieta sin ningún carotenoide (ni comercial ni con los extractos de hongos). E) Yemas de huevo coloradas con extractos de hongos.

Al realizar las pruebas sensoriales al huevo, se determinó que no hubo variación en el sabor del huevo, pero sí la apariencia de la membrana que cubre la yema obteniendo un brillo más intenso. La levadura afecta apreciablemente la pigmentación de la yema, una dieta que contiene aproximadamente de 1% a 2% de levadura seca aumentó el color de la yema. La incorporación de la levadura a la dieta de los pollos es un amplio uso comercial, ya que aparte de que proporcionan coloración a la yema, brindan altas concentraciones de vitaminas del complejo B, proteínas y minerales [25]

Actualmente, existe evidencia científica que expone los beneficios potenciales de los carotenoides en la salud animal y humana. En humanos los beneficios incluyen un incremento de la respuesta inmune, fuente de precursores para vitamina A, agente captador de radicales de oxígeno, y se ha sugerido la inhibición del inicio de enfermedades tales como arterosclerosis, esclerosis múltiple y cáncer, en donde los radicales libres juegan un papel importante en su iniciación [21], [26], [27] y [28]. En el caso de los animales, no pueden sintetizar carotenoides por lo que su presencia en estos organismos se asocia al consumo de estos a través de la dieta. Como elemento adicional cabe destacar que para el año 2005 se estimó un mercado global de \$935 millones asociado al uso de carotenoides como suplemento nutritivo y colorante de alimentos [29].

Conclusiones

Las especies de *Rhodotorula* analizadas en este estudio, coinciden con las otras especies del género ya estudiadas por otros investigadores, donde describen a la levadura como capaces de sintetizar pigmentos carotenoides. *Pycnoporus sanguineus* es un hongo cuya superficie de color rojo-anaranjado se debe a la presencia de carotenoides como pigmentos naturales. Dada la efectividad en la tinción de la yema de huevo, se comprueba que ambos hongos (tanto la levadura como el hongo filamentoso), tienen potencial como colorante natural.

Yo sé que por el licenciamiento del producto no se menciona mucho sobre el aislamiento, purificación y establecimiento del cultivo, pero no sé si es posible indicar muy sutilmente un poco para saber si es de fácil producción pensando en la comercialización.

Referencias

- [1] T. Herrera, y M. Ulloa. "El Reino de los Hongos: micología básica y aplicada". *Fondo de Cultura Económica de España*, 1990.552 p. ISBN: 9789681657376
- [2] DL. Hawksworth. "Mushrooms: the extent of the unexplored potential". *Int J Med Mushrooms*, vol.3, pp: 333–337, 2001. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v3.i4.50
- [3] P. Stamets. "Growing gourmet and medicinal mushrooms", 3rd Edition. *Ten Speed Press, Berkeley, California, EEUU*, 2000.
- [4] T. Mizuno, E. Yamaha, M. Wakahara, A. Kuroiwa, and H. Takeda. "Mesoderm induction in zebrafish". *Nature*, vol.383, N° 6596, pp: 131-132, 1996. DOI: 10.1038/383131a0
- [5] SP. Wasser, and AL. Weis. "Medicinal Properties of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives". *International Journal of Medicinal Mushrooms*, vol. 1, pp: 31-62, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v1.i1.30>
- [6] SP. Wasser and AL. Weis. "Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective". *Crit.Rev Immunol*, vol. 9, N° 1, pp: 65-96, 1999. DOI: [7] T. Ikekawa. "Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms in health care". *Int J Med Mushrooms* vol.3, pp: 291–298, 2001. DOI: [http://www.dl.begellhouse.com/download/article/265eb15d56891c02/IJM%200302-3%20\(79\).pdf](http://www.dl.begellhouse.com/download/article/265eb15d56891c02/IJM%200302-3%20(79).pdf)[8] V.E.C. Ooi y F. Liu. "A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides". *Int J Med Mushrooms*, vol.1, pp: 195– 206, 1999. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.v1.i3.10[9] S.V. Reshetnikov, S.P. Wasser, K.K. Tan. "Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides". *Int J Med Mushrooms*, vol. 3, pp: 361–394, 2001
- [10] U. Lindequist, E. Teuscher, G. and Narbe. "Neue Wirkstoffe aus Basidiomyceten". *Z Phytother*, in German; 244páginas, 1990. [11] C.R. Brandt and F. Piraino. "Mushroom antivirals". *Recent Res Dev Antimicrob Agents Chemother*, vol. 4, pp:11–26, 2000.
- [12] S. Ahmed, C. Pérez, C. Egea and M.E. Candela. "Evaluation of the capacity of *Trichoderma harzianum* controlling rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants". *Plant Pathol*, Vol.48, pp: 58-65, 1999. DOI: 10.1046/j.1365-3059.1999.00317.x
- [13] M. Ezziyyani, C. Sánchez, M.E. Requena, S. Ahmed y M. Candela. "Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*". *Anales de Biología*, vol. 26, pp: 61-68, 2004. DOI: <http://revistas.um.es/analesbio/article/view/30461>
- [14] A.R. Podile and V.DV. Laxmi. "Seed bacterization with *Bacillus subtilis* AF1 increases phenylalanine ammonia lipase and reduces the incidence of fusarial wilt in pigeonpea". *Journal Phytophathol*, vol. 146, pp: 255-259, 1998. DOI: 10.1111/j.1439-0434.1998.tb04687.x
- [15] E., M. Aguirre-Acosta, S. Ulloa, J. Aguilar, R. Cifuentes. "Biodiversidad de hongos en México". *Revista Mexicana de Biodiversidad*, vol. 85, pp: 76-81, 2014. DOI: 10.7550/rmb.33649
- [16] A. Zuluaga-Montero, C. Toledo-Hernández, J.A. Rodríguez, A.M. Sabat, and P. Bayman. "Spatial variation in fungal communities isolated from healthy and diseased sea fans *Gorgonia ventalina* and seawater". *Aquat Biol*, vol. 8, pp: 151–160, jun.2010. DOI: 10.3354/ab00218
- [17] L. Acosta-Urdapilleta, G. A. Paz, M. Rodríguez, D. Salgado, J. Salgado, M. Montiel-Peña, F. Medrano-Vega, y E. C. Villegas Villarreal. "*Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico", *Hacia un Desarrollo*



Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Capítulo 28, pp. 531-562.

- [18] D. Martínez-Carrera, M. Sobal, P. Morales, W. Martínez, M. Martínez y Y. Mayett “Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales, y su contribución a la alimentación mexicana”. *Colegio de Postgraduados, Campus Puebla, Biotecnología de Hongos Comestibles*. Puebla, México.
- [19] D. Somashekar and R. Joseph. “Inverse relationship between carotenoid and lipids formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium World”. *J Microbiol Biotechnol*, vol.16 pp. 491-493, 2000.
- [20] F. Granado, B. Olmedilla, E. Gil-Martinez and I. Blanco. “A fast, reliable and low-cost saponification protocol for analysis of carotenoids in vegetables”. *Journal Food Comp Analyze*, vol.14, pp. 479-489, 2001.
- [21] G. Ferengova and D. Beshkova “Carotenoids from *Rhodotorula* and *PhaYa*: Yeasts of biotechnological importance”. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 36, pp: 163-180, 2009.
- [22] J. Kim, N. Lee, Y. Hahm, M. Baik and B.Kim. “Extraction of β -carotene produced from yeast *Rhodospirium* sp. and its heat stability. *Food Science and Biotechnology*, vol. 19, N°1, pp: 263-266, 2010
- [23] L.C. Mata-Gómez, J.C. Montañez, A. Méndez-Zavala and C.N. Aguilar. “Biotechnological production of carotenoids by yeasts”. *Microbial Cell Factories*, Vol.13, pp.12, 2014. DOI: <http://www.microbialcellfactories.com/content/13/1/12>
- [24] P. Buzzini, M. Innocenti, B. Turchetti, D. Libkind, M. Van Broock and N. Molinacci “Carotenoid profiles of yeast belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*”. *Canadian Journal of Microbiology*, vol.53, pp: 1024-1031, 2007. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01319.x.
- [25] J. White, “Yeast technology”. *John Wiley & Sons, Inc.*, New York. 1954
- [26] A. Jimenez, I. Jimenez, C. Sanchez and F. Saura. “Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl”. *Journal of Science, Food and Agriculture*, vol.80, pp: 1686–1690, 2000. DOI: 10.1002/1097-0010(20000901)80:11<1686:AID-JSFA694>3.0.CO;2-Y
- [27] M. Forman, S. Hursting, A. Umar and J. Barret. “Nutrition and cancer prevention: a multidisciplinary perspective on human trials”. *Annual Reviews of Nutrition*, vol.24, pp: 223–254, 2004. DOI: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132315>
- [28] Y. Kiokias and M.Gordon. “Antioxidant properties of carotenoids *in vitro* and *in vivo*”. *Food Reviews International*, vol.20, pp: 99–121, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1081/FRI-120037155>
- [29] M. Certic, V. Hanusová, E. Breierová, I. Márová, and P. Rapta. “Biotechnological production and properties of carotenoid pigments”. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Hou C, Shaw J (editores). Primera edición. CRC Press. Estados Unidos de América. 442p. 2009