

PRODUCCIÓN FUNGICA DE UN PIGMENTO ROJO EMPLEANDO LA CEPA XEROFILICA *Penicillium purpurogenum* GH-2**FUNGAL PRODUCTION OF THE RED PIGMENT USING A XEROPHILIC STRAIN *Penicillium purpurogenum* GH-2**

A. Méndez-Zavala¹, J. C. Contreras-Esquivel³, F. Lara-Victoriano²,
R. Rodríguez-Herrera¹ y C. N. Aguilar^{1*}

¹*Departamento. de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Unidad Saltillo. Blvd. V. Carranza e. Ing. José Cárdenas V. S/n, Saltillo Coah. CP. 25000., México.*

²*Centro Internacional de Servicios Fitosanitarios, S.A. de C.V. Urdiñola # 360. Zona Centro. Saltillo, Coah. CP. 25000, México.*

³*Coyote Foods. Biopolymers and Biotechnology, S. de R. L. m i. Simón Bolívar No. 851-A. Zona Centro. Saltillo, Coah. CP.25000. México.*

Recibido 5 de Mayo 2007; Aceptado 24 de Octubre 2007

Resumen

En este estudio se evaluó la capacidad del hongo *Penicillium purpurogenum* GH-2, de producir pigmentos tanto en medios líquidos como sólidos, así como en medios mínimos y enriquecidos. La cepa fue capaz de crecer y producir pigmentos en estos medios. Adicionalmente, se probaron 9 medios de cultivo para la producción de pigmentos, en medio sólido. El microorganismo fue capaz de crecer en todos los medios, obteniéndose diferentes velocidades de crecimiento, las mayores velocidades de crecimiento se reportaron en los medios 1, 3 y 9 (0.0903, 0.0874, y 0.0837 cm. h⁻¹, respectivamente). La producción de pigmentos, se observó en 6 de los 9 medios analizados. De acuerdo a los barridos de exploración las máximas absorbancias se encontraron en una longitud de onda entre los 400 – 600 nm, obteniéndose 2 picos significativos de 505 y 425 nm.

Palabras clave: *Penicillium purpurogenum*, pigmentos, producción.

Abstract

In this study, the capacity of *Penicillium purpurogenum* GH2 for pigments production was evaluated in liquid and solid state fermentation, as well using minimum and enriched media. The strain was able to growth and produce pigments in these media. Nine culture media reported for pigment production were evaluated in solid state fermentation. Microorganism was able to of growth in all media tested, obtaining different specific growth rates, the highest specific growth rate was reported in the 1, 3 and 9 media (0.0903, 0.0874, y 0.0837 cm. h⁻¹, respectively). The pigments production, was observed in 6 of the 9 analyzed media. In accordance with the exploration scanning analysis, the values of maximum absorbances were found between 400 and 600 nm; in this regions two peaks at 505 and 425 nm were used to evaluated the pigment concentration.

Keywords: *Penicillium purpurogenum*, pigments, production.

1. Introducción

Los pigmentos son sustancias químicas que imparten color a otros materiales por el efecto óptico de la refracción de la luz del sol. Igualmente un pigmento puede ser definido como una sustancia en polvo que cuando se mezcla con un líquido vehículo imparte color a una superficie (Wani y col., 2004). Debido a esta característica son muy importantes para diversas industrias, como la alimentaria (como aditivos, intensificación de color, etc.), farmacéutica (coloración de vehículos, coloración de cosméticos, etc.), textil (coloración de prendas), etc.

Desde hace mucho tiempo se ha investigado la producción de pigmentos de origen natural, asilando, caracterizando y purificando muchos compuestos de este tipo (Durán, y col., 2002); los cuales se han obtenido a partir de plantas y microorganismos principalmente. Sin embargo los procesos biotecnológicos, parecen ser una mejor alternativa, para la obtención de estos compuestos. El empleo de microorganismos, especialmente los hongos filamentosos, ha traído consigo la generación de nuevas tecnologías, y nuevos pigmentos; así mismo, la obtención de estos productos, puede reemplazar en gran parte el uso de colorantes químicos ó sintéticos.

* Autor para la correspondencia: E-mail: cag13761@mail.uadec.mx

Los hongos filamentosos han sido estudiados por su actividad metabólica, en la generación de una cantidad de metabolitos tanto primarios como secundarios (como los pigmentos), además de su capacidad de producción extracelular, facilitar procesos fermentativos y por los altos rendimientos obtenidos (Carvalho y col., 2003). Los hongos pertenecientes al género *Monascus sp.* han sido estudiados por muchos años y muchos autores refieren a estos hongos, como un potencial productor de pigmentos naturales (Blanc y col., 1994; Carvalho y col., 2003), los cuales se han utilizado como ingredientes alimenticios desde hace muchos años, produciéndose en granos de arroz (Ahmed y col., 2001). Algunas especies de *Monascus sp.* producen pigmentos hidrosolubles y que difunden por todo el medio de cultivo con tonalidades rojas a amarillas; los cuales son aplicados a la industria de los alimentos como ingredientes alimenticios (Blanc y col., 2001).

Monascus sp. no es el único microorganismo que puede producir pigmentos, otros microorganismos como los pertenecientes al género *Paecilomyces sp.* también producen pigmentos en tonalidades rojas, amarillas y violetas; en cantidades de hasta 4.73 gL⁻¹ (Cho y col., 2002). Los hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* también han sido estudiados, como potenciales productores de pigmentos naturales (Engstrom y col., 1982; Larsen y Breinholt, 1999; Suhr y col., 2002). Además se han reportado el uso de microorganismos tales como bacterias, levaduras y actinomicetos, en la producción de pigmentos; como ha sido el caso de *Phaffia rhodozyma* (Fontana y col., 1996; Lim y col., 2002). Esta levadura se ha utilizado para la producción de un pigmento rojo con mucho uso en la industria de los alimentos, la astaxantina, con nombre comercial "AstaXin", comercializada por Igene Biotechnology Inc., Columbia, Maryland; astaxanthin of Mera Pharmaceuticals Inc. (Wani y col., 2004). Otros microorganismos han sido modificados genéticamente para poder producir pigmentos, tal es el caso de *Escherichia coli*, trasformada para la síntesis de carotenoides. (Yokohama y col., 1998).

Los microorganismos endémicos de la región semidesértica de Coahuila, no han sido estudiados en detalle, algunos de ellos presentan mucho potencial industrial (debido al metabolismo muy eficiente que presentan como resultado de las condiciones extremas en las que se llegan a desarrollar). Recientemente Espinoza (2004), caracterizaron fisiológica, morfológica y molecularmente 3 cepas de *Penicillium sp.* aisladas del semidesierto de Coahuila (Cruz-Hernández y col., 2005), con uso potencial en la producción de pigmentos, en sus estudios encontraron que a una temperatura de 24°C y a un pH inicial de 10, las cepas en medio tanto sólidos como líquidos, producen el pigmento.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la producción de pigmentos en condiciones de cultivo tanto líquido como sólido. Y comparar 9 medios de cultivo para la producción de pigmentos y su influencia en el crecimiento de la cepa de *Penicillium purpurogenum* GH-2, aislada de la región semidesértica de Coahuila, México.

2. Metodología.

2.1. Cepa

Se utilizó la cepa *Penicillium purpurogenum* GH-2, de la colección D.I.A - U.A.deC. Previamente aislada y purificada por Cruz-Hernández y col. (2005), y caracterizada morfológica, fisiológica y molecularmente por Espinoza - Hernández (2004). El microorganismo se conservó mediante una cosecha de esporas en una solución acuosa de leche descremada (9 %) y glicerol (10 %) a pH 7. Y se colocó en congelación a -21° C en tubos eppendorf estériles.

2.2. Medios y condiciones de cultivo

Para la producción del pigmento la cepa se sembró en medios de PDA, y en agar Czapek-dox para medios sólidos y se incubó a 28°C de 5 - 7 días.

Para la producción del pigmento en medio líquido se prepararon 1000 mL. de una infusión de papa, ajustando el pH a 3.5 con ácido tartárico antes de esterilizar. La fermentación se llevó a cabo en un biorreactor Fermentation Design, con un reactor de vidrio de 2000 mL. (Pyrex); con una agitación de 200 r.p.m. y una temperatura de 30°C. Se preparó medio Czapek-dox, líquido, con ácido tánico como única fuente de carbono, se colocó en un agitador Multi-Wrist marca LAB-LINE a 3.5 unidades de movimiento a una temperatura de 30°C.

Con el extracto crudo pigmentado se realizaron pruebas de solubilidad usando como solventes agua, etanol (96°) y acetona. En los cultivos sólidos, se removieron las esporas y el micelio con agua destilada, y el agar se partió y se colocó en morteros donde se maceró con los diferentes disolventes, de la misma manera se colocó en vasos de precipitado muestras maceradas y muestras solo partidas, y agregándose los solventes mencionados para probar la solubilidad del pigmento.

Para probar la estabilidad del pigmento y su resistencia a la degradación por la temperatura, se esterilizaron los matraces con el medio, el hongo y el pigmento, en una autoclave marca All American modelo 25X-1 a 15 libras de presión por 15-20 minutos.

2.3. Evaluación del crecimiento y la producción de pigmentos

Para la evaluación del crecimiento y pigmentación se probaron 9 medios de cultivos reportados con anterioridad para la producción de pigmentos en hongos *Monascus* y *Paecilomyces sp.* (Tabla 1).

La cepa fue crecida sobre agar de papa y dextrosa (PDA), a 30°C, por 5 – 7 días, donde presentó esporulación de color verde, con crecimiento radial, y la pigmentación se observó al reverso de la colonia, de color rojo, y difundida en todo el medio de cultivo. Esta cepa se mantuvo en refrigeración a 4°C (+/- 2°C), hasta su empleo en las pruebas.

Tabla 1. Medios de Cultivo utilizados para producir pigmentos usando la cepa de *P. purpurogenum* GH-2.

Medio	Clave	Referencia
1	YCSO ₃	Su, 1983
2	YJalm	Cho y col., 2002
3	Bas	Cho y col., 2002
4	Bl	Blanc y col., 1994
5	Bc	Kim y col., 1999
6	CH	Kim y col., 1999
7	H	Shin y col., 1998
8	YJ	Cho y col., 2002
9	YM	Su, 1983

2.4. Determinación de la Velocidad de Crecimiento

El crecimiento radial y la producción de pigmentos fueron evaluados diariamente en los 9 medios distintos (por triplicado). Los medios fueron incubados a 24°C por 7-10 días. El crecimiento radial fue medido milimetricamente de los 4 puntos cardinales.

2.5. Selección de la longitud de onda y medición de los pigmentos

Al final del período de incubación, los medios fueron guardados en refrigeración a 4°C (+/- 2), por 1 día para su posterior análisis. Se analizaron los medios en donde existía pigmentación roja, los demás medios se descartaron por no presentarse la pigmentación. Los pigmentos fueron extraídos de acuerdo al método reportado por Shin y col., (1998). Después de la extracción, el líquido pigmentado se centrifugó a 14, 000 rpm, durante 10 minutos, en una microcentrifuga, Eppendorf, Centrifuge 5415 D. El sobrenadante se transfirió a frascos de 20 mL por decantación. Este sobrenadante fue empleado para realizar el barrido de exploración el cual se llevo a cabo en el espectro visible (400 – 800 nm), empleando un Espectrofotometro Cintra 20 UV – Visible Spectrometer. Los valores de absorbancia de

los pigmentos se analizaron directamente del barrido de exploración.

3. Resultados y discusión.

3.1. Condiciones de producción del pigmento

La producción del pigmento se observó en medio PDA y en agar Czapek-dox con ácido tánico como fuente de carbono. En algunos experimentos el hongo se sembró en PDA donde no produjo pigmento, se sembró entonces en Czapek-dox con ácido tánico como fuente de carbono y un pH de 6.5 - 6.6 observándose la producción del pigmento y el crecimiento del hongo. Después de resembrar en PDA se logró observar la producción de pigmento con tonalidades más fuertes y difundido por todo el medio. Si el hongo se hace crecer directamente sobre PDA, la producción del pigmento es positiva, pero se observa una difusión en el medio menor a comparación de la producida en el mismo medio, pero con previo estrés en el medio Czapek-dox con ácido tánico como fuente de carbono.

La producción de pigmentos en medio líquido Czapek-dox con ácido tánico como única fuente de carbono se observó solo a nivel intracelular y no se excreto al medio de cultivo.

En la fermentación realizada en infusión de papa se observó la producción de pigmento en el micelio a los 3 días de haberse inoculado, la difusión del pigmento en el medio a los 5 días. A los 8 días se observó una coloración roja más intensa.

De acuerdo con estos experimentos se determinó que el pigmento es hidrosoluble, y presentó una alta estabilidad; sin embargo deben de llevarse a cabo más estudios para confirmar los resultados preliminares.

3.2. Evaluación del crecimiento y producción de pigmentos

El crecimiento del hongo filamentoso *Penicillium purpurogenum* GH-2, fue diferente en cada medio de cultivo analizado, observándose un crecimiento de tipo radial y muy lento, en la mayoría de los medios; obteniendo el crecimiento de 40 mm máximo por caja en un período de tiempo de 500 horas (Fig. 1).

Se obtuvo además la velocidad de crecimiento, por medio de la relación del crecimiento y el tiempo, al obtener una línea en donde la pendiente corresponde a la velocidad de crecimiento radial, en cada medio. Las mayores velocidades de crecimiento radial, se obtuvieron en los medios 1, 3 y 9 (0.0903, 0.0874, y 0.0837 cm. h⁻¹, respectivamente); estos fueron los valores mayores de crecimiento, sin embargo, en los medios 2, 4, 7 y 8 se obtuvieron valores muy parecidos entre ellos (0.0793, 0.0748, 0.0784 y 0.0712 cm. h⁻¹ respectivamente) y cercanos a los máximos valores;

y en los medios 5 y 6 se encontraron los valores más bajos de velocidad de crecimiento, 0.0345 y 0.0567 cm h^{-1} , respectivamente (Fig. 2).

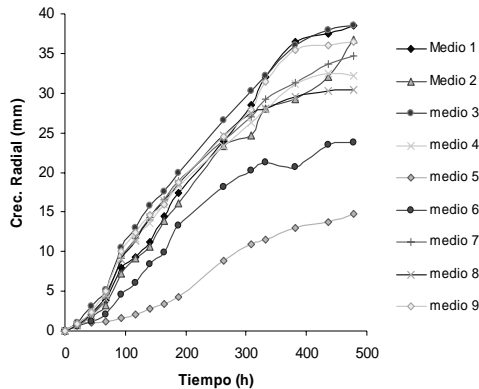


Fig. 1. Medición del crecimiento radial de *P. purpurogenum* GH- 2; en 9 medios de cultivo diferentes, durante 500 horas.

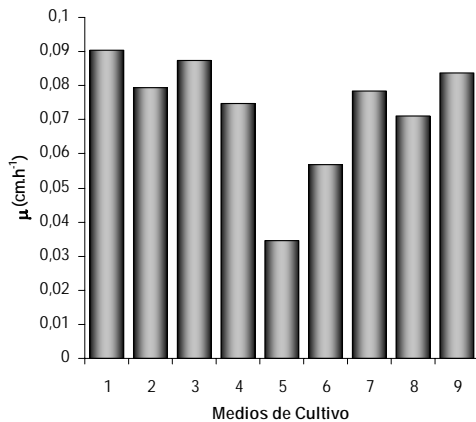


Fig. 2. Velocidad específica de crecimiento (μ cm.h^{-1}) de *P. purpurogenum* GH2, sobre 9 medios de cultivo diferentes.

3.3. Producción de pigmento en diferentes medios.

La producción de pigmentos, se observó en 6 de los 9 medios analizados, con tonalidades rojas en diferentes intensidades, a excepción de 3 de ellos en donde la pigmentación fue muy poca o no hubo producción (Fig. 3 y 5).

De acuerdo a los barridos de exploración las máximas absorancias se encontraron a una longitud de onda entre los 400 – 600 nm, obteniéndose 2 picos significativos de 505 y 425 nm, estos 2 picos aparecieron en los 6 medios en donde se produjo la pigmentación. De acuerdo con otros autores la presencia de estos dos picos pueden deberse a la mezcla de 2 o más pigmentos, para pigmentos amarillos-naranjas longitudes de onda de 405 nm y rojos de 495 nm en pigmentos de *Monascus* (Domínguez– Espinosa y col., 2002), y longitudes de onda de 400 nm para pigmentos amarillos, 470 para

naranjas y 500 para pigmentos rojos (Cho y col., 2002b), en pigmentos de *Paecilomyces*.

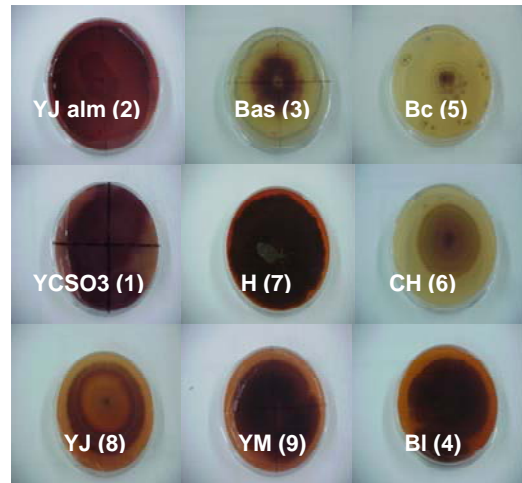


Fig. 3. Producción de pigmentos sobre diferentes medios de cultivo, a partir de *P. purpurogenum* GH-2.

Sin embargo la máxima absorción de pigmentos rojos producidos por hongos filamentosos se da en el rango de los 500 nm, teniendo concordancia con los valores obtenidos en esta investigación. Se puede considerar que estas 2 longitudes de onda pueden ser una mezcla de pigmentos en donde uno de ellos se enmascare por el otro al estar uno en mayores cantidades, o bien estos 2 picos de absorancia máxima pueden deberse a que existan isómeros de una misma molécula de pigmento (con diferentes sustituyentes o protonados). Lo cual puede ser lo más probable, debido a que en este trabajo encontramos para el medio 7 la máxima absorancia, que esta se obtuvo a los 425 y no a los 505 nm, presentando una tonalidad roja, lo cual no corresponde a los datos encontrados por otros autores, aún así en este medio se observó la máxima absorancia en las 2 longitudes de onda obtenidas (Fig. 4). La medición de los pigmentos de *P. purpurogenum* GH-2, analizados directamente de los barridos, (Fig. 5), proporcionó los máximos valores de absorancia para cada uno de los diferentes medios, encontrando que en el medio 7 (Shin y col., 1998), se obtuvo el valor más alto de absorancia (Fig. 6), seguido por los medios 9 (Su, 1983), 2 (Cho y col., 2002a), 1 (Su, 1983), 4 (Blanc y col., 1994) y 8 (Cho y col., 2002a), como reflejo de la cantidad de pigmento presente en la muestra.

Nuestro equipo ha trabajado con cepas de *P. purpurogenum*, para la producción de pigmentos en diferentes medios de cultivo, encontrando que este microorganismo es capaz de producir pigmentos rojos en diferentes medios de cultivo, con diferentes fuentes de carbono, y de nitrógeno; aún así se obtuvieron pigmentos con características similares de

color, y propiedades de absorción en el espectro visible (Méndez-Zavala y col., 2002, 2004).

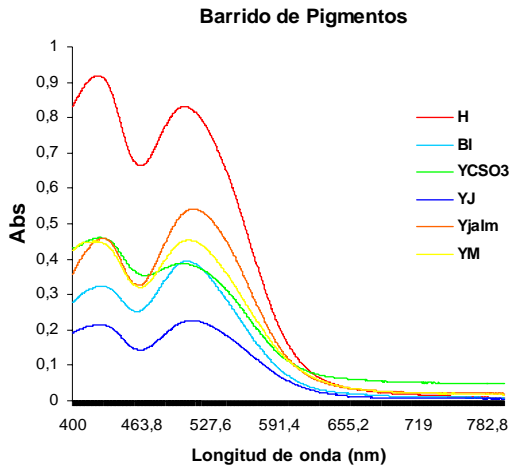


Fig. 4. Barrido de exploración en el Espectro Visible (400 – 800 nm) de los 6 medios de cultivo en donde se observó la producción de pigmentos.

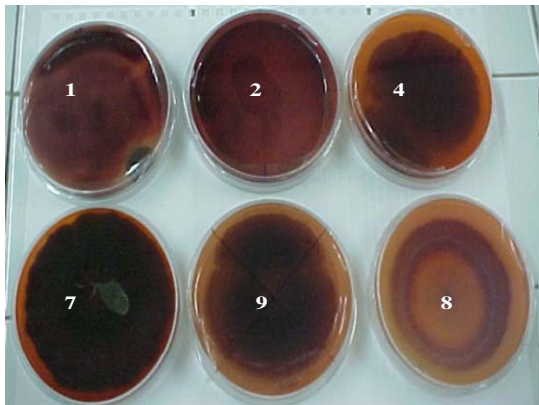


Fig. 5. Producción de pigmentos sobre diferentes medios de cultivo. 1. YCSO₃; 2. YJ alm. 4. BI. 7. H. 8. YJ. 9. YM.

La producción de pigmentos por *P. purpurogenum* GH-2, en 6 de los 9 medios probados está influenciada por la presencia de sustratos complejos de menor asimilación por el microorganismo como los presentes en los medios en donde se obtuvo la mayor coloración (medios 7, 2, 9), que aquellos compuestos de más fácil asimilación. En estos medios la presencia de compuestos tales como Sacarosa (100 gL⁻¹), extracto de malta, ácido casamino, y mayor cantidad de sales, incremento la coloración, así como en los otros 2 medios la presencia de almidón, y extracto de malta, marcaron la alta pigmentación encontrada en los respectivos medios; datos similares encontrados por otros autores en donde la presencia de componentes de alto peso molecular o de polisacáridos, tales como el almidón incrementan la producción de pigmentos (Cho y col., 2002a), así como la presencia de

sacarosa a tenido efectos positivos sobre la producción de pigmento, en cantidades menores que en el caso de almidón, más sin embargo teniendo resultados positivos a menor costo (Cho y col., 2002a). Su, en 1983, utilizando una cepa de *Monascus*, encontró que el uso de arroz en polvo, favorece la producción de pigmentos tanto intra como extracelularmente, a comparación de fuentes de carbono como la glucosa. De igual manera la fuente de nitrógeno marca un efecto muy significativo sobre la expresión de estos compuestos, encontrándose que con el uso de fuentes orgánicas de nitrógeno, el incremento en la producción de pigmentos a comparación de las fuentes inorgánicas (Cho y col., 2002b). Su (1983), encontró que las fuentes de nitrógeno orgánicas tales como el monoglutamato de sodio (MSG), el ácido casamino, incrementan la producción de pigmentos, y la presencia de nitrato de potasio también influye de manera positiva en la producción de pigmentos.

En lo que respecta a los medios en donde no se observó pigmentación, se asoció a la presencia de compuestos sustratos monosacáridos.

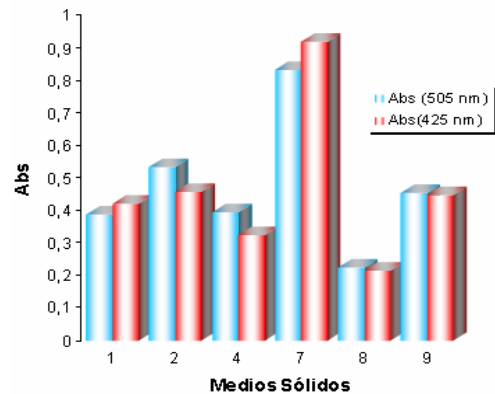


Fig. 6. Absorbancia de los pigmentos de *Penicillium purpurogenum* GH-2, sobre los 9 medios de cultivo diferentes.

En el caso del medio 5, la presencia de caseína tanto como fuente de carbono y nitrógeno no favoreció el crecimiento micelial y por lo tanto no se observó la producción de pigmentos. Con el medio No. 3 podemos observar que a comparación de medios como el 7 y 9, por ejemplo; la producción de pigmentos es mínima (Fig. 3), esto debido a la presencia de glucosa que favorece el crecimiento más que la producción de pigmentos, (Su, 1983) y tomando en cuenta que las fuentes de nitrógeno, aún siendo orgánicas no favorecieron una adecuada pigmentación en el medio, pero sí en el micelio, pues la baja concentración de estos y la presencia de glucosa, favoreció el crecimiento y no la producción de pigmentos. Con el medio 6, sucede algo similar, pues la presencia de dextrosa, en cantidades bajas (2.0 gL⁻¹) favoreció el crecimiento y no la producción de pigmentos, aún y cuando la presencia

de fuentes de nitrógeno presentes en este medio favorecería la producción de pigmentos.

Conclusiones

La cepa de *P. purpurogenum* GH-2, es capaz de crecer y producir pigmentos sobre diferentes medios, con diversos sustratos, obteniendo diferentes velocidades de crecimiento relativamente bajas (0.0903 cm. h⁻¹, en el medio 1, como máxima velocidad). En el medio 7 se obtuvo el nivel más alto de pigmentación aún cuando no tuvo la mejor velocidad de crecimiento radial. Con este estudio se puede establecer la necesidad de optimizar el proceso para la producción de pigmentos de interés industrial y la caracterización molecular del pigmento, además de dar una idea del tipo de metabolismo y las necesidades de nutrientes involucrados en la producción de pigmentos. El obtener pigmentos de origen fúngico para su aplicación en diversas industrias, se hace utilizando tecnologías limpias mediante procesos biotecnológicos, y con posibles altos rendimientos, bajos costos y disminución de tiempo y materias primas; además de no generar productos de desecho tóxicos. Se han reportado muy pocos estudios sobre la producción de pigmentos a partir de *Penicillium* sp. siendo esta propuesta uno de los estudios más originales en México para la exploración y explotación de este tipo oportunidades.

Agradecimientos

Al Centro Internacional de Servicios Fitosanitarios, S.A. de C.V.

Referencias

Ahmed, Y.G.; Hamdy, M.E.; Mohmed, H.M. y Esam, Z.A. (2001). Production of natural microbial pigments using rice grain waste. P08-23. 11th World Congress of Food Science and Technology. Seoul, Korea.

Blanc, P. J., Loret, M. O., Santerre, A. L., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J. C., Laussac, J. P. and Goma, G. (1994). Pigments of *Monascus*. *Journal of Food Science* 59 (4), 862-865.

Blanc, P.J.; Loret, M.O. y Goma, G.A. (2001). Control of the production of metabolites by *Monascus* in submerged culture. Tu04-2. 11th World Congress of Food Science and Technology. Seoul, Korea.

Carvalho, J. C., Pandey, A., Babitha, S. and Soccol, C. R. (2003). Production of *Monascus* biopigments: An overview. *AgroFOOD industry hi-tech*. 6, 37-42.

Cho, Y. J., Hwang, H. J., Kim, S. N., Song, C. H. and Yun, J. W. (2002a). Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a

batch bioreactor. *Journal of Biotechnology* 000, 1-11.

Cho, Y. J., Park, J. P., Hwang, H. J., Kim, S. W., Choi, J. W. and Yun, J. W. (2002b). Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. *Letters of Applied Microbiology* 35, 195-202.

Cruz – Hernández, M., Contreras – Esquivel, J. C., Lara, F., Rodríguez, R and Aguilar, C. N. (2005). Isolation and evaluation of tannin – degrading strains from the mexican desert. *Journal of Biosciences C*. In press.

Domínguez – Espinosa, R.M., Wang, R. and Pacho – Carrillo, J. D. (2002). Residuos agroindustriales como materia prima para la producción de compuestos químicos finos. *Tecnología Ciencia Ed. (IMIQ)* 17(2), 77-83.

Durán, N., Teixeira, M. F. S., De Conti, R. and Espósito, E. (2002). Ecological – Friendly Pigments From Fungi. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42 (1), 53-66.

Engstrom, G. W., Stenkamp, R. E., McDorman, D.J. and Jensen, L. H. (1982). Spectral Identification, X – ray Structure Determination, and Iron – Chelating Capability of Erythroglaucon, a Red Pigment from *Aspergillus ruber*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 30, 304-307.

Espinoza - Hernández, T.C. (2004). Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de tres cepas fúngicas productoras de pigmentos. *Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila, Coahuila, México*.

Fontana, J. D., Czezuga, B., Bonfim, T. M. B., Chociai, M. B., Oliveira, Guimaraes, M. F. and Baron, M. (1996). Bioproduction of Carotenoids: The Comparative use of Raw Sugarcane Juice and Depolymerized Bagasse by *Phaffia rhodozyma*. *Bioresources Technology* 58, 121-125.

Kim, C.-H., Kim, S.-W. and Hong, S.- I. (1999). An integrated fermentation – separation process for the production of red pigment by *Serratia* sp. KH-95. *Process Biochemistry* 35, 485-490.

Larsen, T. O. and Breinholt, J. (1999). Dichlorodiaportin, Diaportinol, and Diaportinic Acid: Three Novel Isocoumarins from *Penicillium nalgiovense*. *Journal of Natural Products* 62, 1182-1184.

Lim, G. -B., Lee, S. -Y., Lee, E. -K., Haam, S. -J. and Kim, W. -S. (2002). Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. *Biochemistry Engineering Journal* 11, 181-187.

Méndez – Zavala, A., C. N., Aguilar., Rodríguez Herrera, R. (2002). Producción de pigmentos por cepas de *Penicillium* sp, aisladas de la región semidesértica de México. *1er*

- Simposium Internacional de Alimentos*; Saltillo, Coahuila, México.
- Méndez – Zavala, A., C. N., Aguilar., Rodríguez Herrera, R. (2004). Producción de pigmentos por *P. purpurogenum* GH2, aislado de la región semidesértica de Coahuila, México. A-38. *Memorias del IV Encuentro Nacional de Biotecnología*. Santa Cruz, Tlaxcala, México.
- Shin, C. S., Kim, H. J., Kim, M. J. and Ju, J. Y. (1998). Morphological Change and Enhanced Pigment Production of *Monascus* When Cocultured with *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering* 59(5), 576-581.
- Su, Y. C. (1983). Fermentative Production of Anka-pigments (*Monascus*-pigments). *Korean Journal of Applied Microbiology and Bioengineering* 11(4), 325-337.
- Suhr, K. I., Haasum, I., Streenstrup, L. D. and Larsen, T. O. (2002). Factors Affecting Growth and Pigmentation of *Penicillium caseifulvum*. *Journal of Dairy Science* 85(11), 2786-2794.
- Wani, K. S., Naphade, B. S., Chaudhari, B. L. and Chincholkar, S. B. Pigment Production, in Concise Encyclopedia of Bioresource Technology. Ashok Pandey, PhD. The Haworth Reference Press, Inc. (2004). 645-652.
- Yokohama, A., Shizuri, Y. and Misawa, N. (1998). Production of New Carotenoids, Astaxanthin Glucosides, by *Escherichia coli* Transformants Carrying Carotenoid Biosynthetic Genes. *Tetrahedron Letters* 39, 3709-3712.