

ASTAKSANTIN DARI BAKTERI LAUT: BIOSINTESIS, MANFAAT, DAN POTENSI PRODUKSI MASSAL

Naely Kurnia Wusqy*) dan Ferry Fredy Karwur**)

ABSTRAK

Astaksantin (3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione) adalah ksantofil berwarna merah oranye yang tersusun atas 40 atom karbon terhubung dengan ikatan tunggal dan rangkap membentuk rantai fitoen yang seluruh isomer trans-nya ditemukan di alam bersama sejumlah kecil isomer 9-cis dan 13-cis. Rantai fitoen pada astaksantin diawali dan diakhiri cincin ionon. Astaksantin termasuk dalam golongan ksantofil karena memiliki oksigen pada cincin ionon. Beberapa bakteri laut yang dilaporkan memproduksi astaksantin di antaranya adalah *Brevundimonas*, *Paracoccus hundaenensis*, *Alcaligenes*, dan *Agrobacterium aurantiacum*. Kajian ilmiah ini memaparkan produksi astaksantin di dalam sel bakteri laut mencakup biosintesisnya dari konversi β -karoten menjadi astaksantin dan enzim yang berperan di dalamnya, maupun produksi massal astaksantin untuk keperluan komersial. Selain itu kajian ilmiah ini akan membahas mengenai manfaat astaksantin dalam bidang pangan dan kesehatan.

ABSTRACT: *Astaxanthin produced by marine bacteria: biosynthesis, uses, and the potency of mass production. By: Naely Kurnia Wusqy and Ferry Fredy Karwur*

*Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4, 4'-dione) is an orange-red xanthophylls that contains 40 carbon atoms which is connected by single and double bonds to form fitoen chains in which their all-trans isomer are found in nature together with a small amount of 9-cis and 13-cis isomers. Fitoen chains of astaxanthin begin and end by ionon chains. Astaxanthin belongs to the xanthophylls group because it has oxygen rings. Some marine bacteria are reported to produce astaxanthin i.e *Brevundimonas*, *Paracoccus hundaenensis*, *Alcaligenes* and *Agrobacterium aurantiacum*. This paper describes astaxanthin production in marine bacterial cells including its biosynthesis from β -carotene conversion and enzyme taking a role in this biosynthesis, and its mass production for commercial purposes. This review also describes about their uses for food and health purposes.*

KEYWORDS: *astaxanthin, marine bacteria, Paracoccus sp.*

PENDAHULUAN

Karotenoid yang terdapat di sebagian besar sayuran, buah-buahan, ikan, dan kerang-kerangan, sangat menarik perhatian kita terutama manfaatnya di bidang kesehatan. Manfaat tersebut di antaranya berfungsi dalam pencegahan penyakit kronis seperti penyakit jantung, kanker, dan degradasi umur (Fraser & Bramley, 2004). Karotenoid juga telah dikembangkan untuk aplikasi industri, yakni sebagai agen pewarna pada budidaya ikan dan kerang-kerangan (Johnson & An, 1991). Karotenoid memiliki nilai potensial baik untuk farmasi maupun untuk industri makanan. Beberapa penelitian tentang karotenoid menyatakan bahwa masing-masing karotenoid memiliki karakteristiknya sendiri (Mannisto *et al.*, 2004).

Berdasarkan unsur kimia yang terkandung, karotenoid terbagi menjadi dua kelompok yaitu karoten dan ksantofil. Karoten merupakan senyawa karotenoid

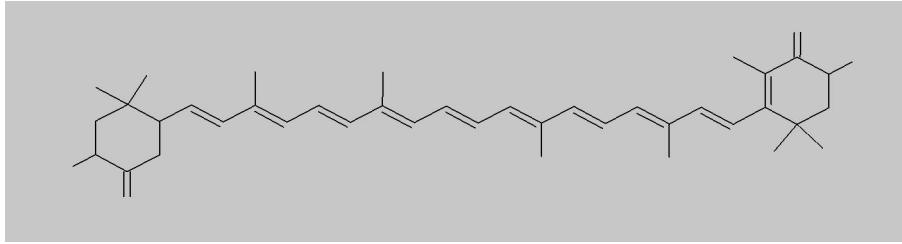
yang mengandung unsur hidrogen dan karbon, sedangkan ksantofil merupakan senyawa karotenoid yang selain mengandung hidrogen dan karbon, juga mengandung oksigen (Britton *et al.*, 1995).

Astaksantin (3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione) adalah ksantofil berwarna merah oranye (Yokoyama *et al.*, 1994) yang tersusun atas 40 atom karbon terhubung dengan ikatan tunggal dan rangkap membentuk rantai fitoen yang seluruh isomer trans-nya ditemukan di alam bersama sejumlah kecil isomer 9-cis dan 13-cis (Visser *et al.*, 2003). Rantai fitoen pada astaksantin diawali dan diakhiri cincin ionon (Gambar 1). Astaksantin termasuk dalam golongan ksantofil karena memiliki oksigen pada cincin ionon (Jyonouchi *et al.*, 1995).

Beberapa bakteri laut yang dilaporkan memproduksi astaksantin di antaranya adalah *Brevundimonas* sp. (Yokoyama *et al.*, 1996), *Paracoccus hundaenensis* (Lee *et al.*, 2004), *Alcaligenes*, dan *Agrobacterium aurantiacum* yang

*) Department of Bioscience Kwansei Gakuin University, Japan; Email: naely_wusqy@yahoo.com

**) Magister Biologi Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga



Gambar 1. Struktur astaksantin (Britton *et al.*, 1995).

sekarang dimasukkan dalam kelompok *Paracoccus* N81106 (Yokoyama *et al.*, 1994).

LINTASAN UMUM BIOSINTESIS ASTAKSANTIN

Jalur biosintesis karotenoid pada umumnya sama dengan semua jenis isoprenoid, yakni diawali dengan isomerasi IPP (isopentenil pirofosfat) yang selanjutnya digunakan dalam sintesis 2 molekul GGPP (Geranylgeranyl pyrophosphate) yang memiliki 20 karbon. Pembentukan 2 molekul GGPP menjadi 15,15'-cis fitoen terjadi melalui reaksi kondensasi, dilanjutkan dengan reaksi desaturasi yang mengubah 15,15'-cis fitoen menjadi *all-trans* likopen dan reaksi siklikasi yang mengubah *all-trans* likopen menjadi *all-trans* β-karoten. Selanjutnya pada lintasan biosintesis astaksantin dari β karoten (Gambar 2), mengalami 2 reaksi kimia yaitu hidroksilasi dan oksidasi (Misawa *et al.*, 1995).

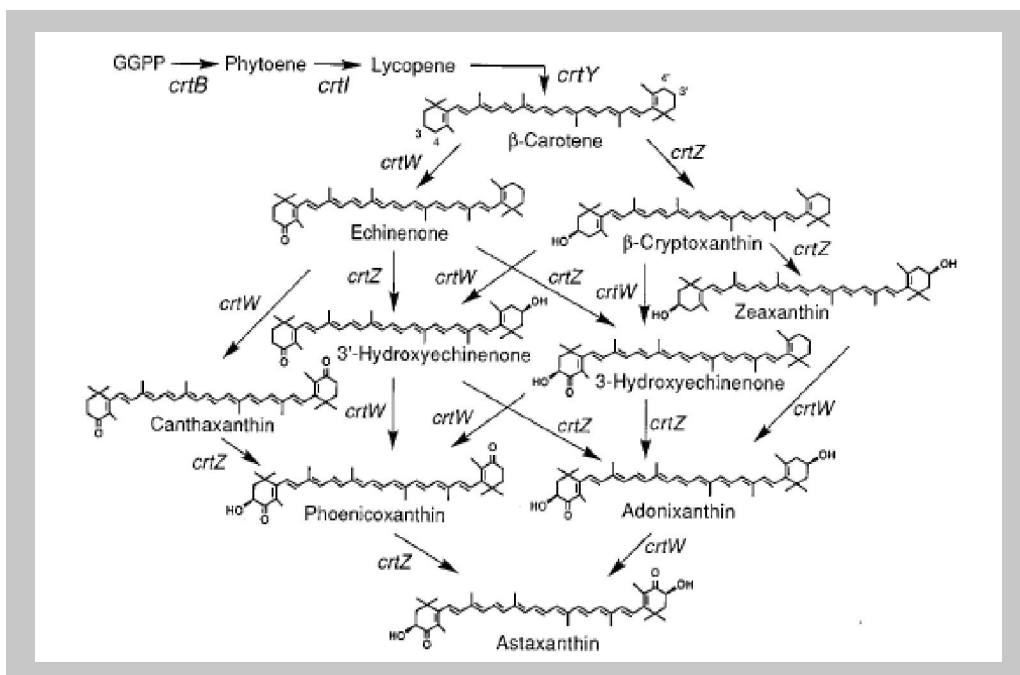
Ada 2 jalur pembentukan astaksantin, yang pertama yaitu peningkatan jumlah adonixantin

dan zeaksantin, sedangkan jalur yang kedua yaitu melalui peningkatan jumlah kantaksantin dan foenikoksantin sehingga menghasilkan astaksantin sebagai produk akhir.

Enzim yang Terlibat dalam Biosintesis Astaksantin

Dua enzim yang berperan dalam mengubah β-karoten menjadi astaksantin adalah 4-4' oksigenase (*CrtW*) dan 3-3' hidroksilase (*CrtZ*). Enzim *CrtW* dan *CrtZ* bakteri laut memiliki 2 fungsi pada aktivitasnya (Fraser *et al.*, 1997). Enzim ini terlihat spesifik pada reaksi kimia tetapi tidak spesifik untuk substrat. *CrtZ* dan *CrtW* mampu menggunakan substrat dengan perbedaan polaritas yang besar, sehingga 6 kelompok ketokarotenoid dapat disintesis hanya dengan 2 jenis enzim ini (Misawa *et al.*, 1995).

β karoten C-4 ketolase (*CrtW*) menggabungkan 2 gugus keto pada C-4 dan C-4' pada molekul β karoten. Substrat *CrtW* menggunakan β-ionone dan cincin 3-



Gambar 2. Skema lintasan biosintesis astaksantin pada bakteri laut (Misawa *et al.*, 1995).

hidroksi- β -ionone. Enzim ini mengkatalisis konversi langsung gugus metilen (pada gugus posisi 4-4' β karoten) yang memproduksi echinenone dan kantaksantin. Enzim ini ditemukan pada bakteri laut *Paracoccus* sp. (Misawa *et al.*, 1995). Sedangkan β karoten hydroxylase (*CrtZ*) memiliki 2 gugus hydroxyl pada C-3 dan C-3' (An *et al.*, 1999). Substrat *CrtZ* adalah cincin β -ionone dan 4-keto- β -ionon. Secara umum, enzim ini memasukkan satu atom oksigen dari molekul oksigen ke substratnya dan memerlukan sebuah donor elektron untuk mengurangi atom oksigen ke dua ke dalam air. Dua kelompok besar β karoten hidroksilase yang kita kenal adalah non heme di iron (NH-di-iron) hidroksilase yang dihubungkan dengan desaturasi asam lemak dan sitokrom P-450 monooksigenase (Martin *et al.*, 2008). Tipe NH di-iron dari β karoten hidroksilase ini memerlukan molekul oksigen, zat besi (iron), feredoksin dan feredoksin oksido reduktase untuk aktivitasnya. Hal ini sama dengan motif histidin yang memerlukan ikatan iron dan penting untuk aktivitas enzimnya (Bouvier *et al.*, 1994)

Selain *CrtW* dan *CrtZ*, ada beberapa enzim lain yang terlibat dalam biosintesis astaksantin, di antaranya enzim kamfor hidroksilase, abietadiena dan abietadienol hidroksilase yang terdapat hanya sekitar 10–20% atau 1% dari kapasitas *in vivo*-nya (Funk & Croteau, 1994).

Gen yang Terlibat dalam Biosintesis Astaksantin

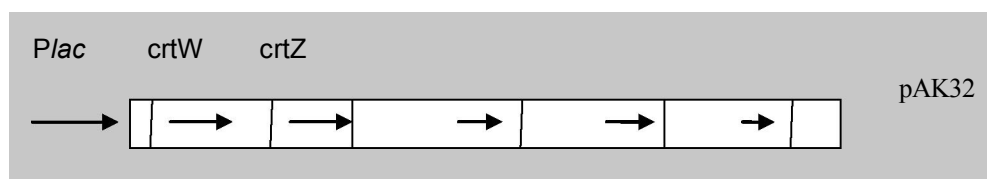
Dalam mensintesis astaksantin, bakteri laut memiliki 5 gen *Crt* yang secara fisik saling berhubungan, dan memiliki gen yang berfungsi sebagai promotor tunggal yang bertanggung jawab pada ekspresi seluruh gen karotenoid (Misawa *et al.*, 1995). Gen yang berperan dalam biosintesis astaksantin adalah *crtE* (Lodato *et al.*, 2004), *crtI*, *crtW*, *crtY*, dan *crtZ*. Struktur organisasi kelompok gen yang bertanggung jawab pada biosintesis karotenoid *Agrobacterium aurantiacum* dapat dilihat pada Gambar 3.

Gen *crtE* mengkode sintesis Geranylgeranyl pyrophosphate sintase (GGPP). Gen *crtB* mengkode

sintesis fitoen yang mengkatalisis reaksi kondensasi dari 2 molekul GGPP untuk memproduksi 15,15'-cis fitoen. Gen *crtI* mengkode desaturasi fitoen, yang bertanggung jawab pada konservasi 15,15'-cis fitoen ke seluruh likopen trans. Gen *crtY* mengkode siklikasi likopen, di mana gen ini mengkatalisis reaksi siklikasi terminal dari seluruh likopen trans ke seluruh β -karoten trans. Gen *crtZ* mengkode β -karoten hidroksilase yang mengkatalisis reaksi hidroksilasi dari β -karoten menjadi (3R,3R')-zeaksantin melalui β -kriptoksantin (Misawa *et al.*, 1995). Gen *crtW* mengkode β -karoten ketolase (β -karoten oksigenase), yang mengkatalisis metilen menjadi gugus keto untuk mensintesis kantaksantin dari β -karoten melalui ekinenon (Lotan & Hirschberg, 1995). Gen *crtW* juga memiliki 2 fungsi yaitu tidak hanya mengubah cincin β -ionon tetapi juga cincin 3-hidroksi- β -ionon menjadi cincin 4-keto- β -ionon dan menjadi cincin 3-hidroksi-4-keto- β -ionon.

Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Biosintesis Astaksantin pada Sel

Faktor-faktor yang berpengaruh pada biosintesis astaksantin di antaranya adalah oksigen, intensitas cahaya, keberadaan Fe dan adanya faktor kinetik. Keberadaan oksigen sangat penting pada saat hidroksilasi karotenoid dan oksigenasi. Oksigen terlibat dalam seluruh reaksi enzim yang melibatkan *CrtZ* dan *CrtW* pada bakteri laut. Gen-gen biosintesis karotenoid sangat responsif terhadap intensitas cahaya. Pada intensitas cahaya tinggi, jumlah mRNAs pada gen-gen *crt* (*crtB*, *crtI*) menunjukkan peningkatan dibanding pada intensitas cahaya rendah (Zhu & Hearst, 1986). Meskipun beberapa faktor lingkungan laut berperan penting dalam pembentukan astaksantin yang ada pada bakteri laut, biokimia dasar enzim juga merupakan faktor yang berpengaruh pada biosintesis astaksantin. Ketidakhadiran spesifitas substrat menunjukkan enzim pada jalur biosintesis menghasilkan formasi produk yang berbeda yang dapat menjadi fitur umum di antara kelas terpenoid yang lain (Pogson *et al.*, 2003).



Gambar 3. Kelompok gen yang bertanggung jawab pada biosintesis karotenoid *Agrobacterium aurantiacum* (Misawa *et al.*, 1995).

MANFAAT DAN PRODUKSI ASTAKSANTIN

Astaksantin dan Manfaatnya di Bidang Kesehatan

Dalam berbagai penelitian, astaksantin terbukti merupakan antioksidan potensial yang dapat membantu mempertahankan kesehatan tubuh (Lorenz, 2000). Beberapa peneliti telah membuktikan bahwa astaksantin mencegah penyakit kardiovaskular dengan mekanisme antioksidan. Iwamoto *et al.* (2000) membuktikan bahwa konsumsi mikroorganisme yang menghasilkan astaksantin dapat menghambat oksidasi LDL dan mencegah arteriosklerosis. Selain itu Hussein *et al.* (2005) pertama kali menemukan bahwa astaksantin bermanfaat dalam perlindungan terhadap hipertensi dan stroke. Astaksantin juga dilaporkan meningkatkan respon imun antitumor dengan menghambat peroksidasi lipid yang diinduksi oleh stres oksidatif (Kurihara *et al.*, 2002).

Selain fungsi-fungsi di atas, astaksantin juga memiliki banyak fungsi yang lain, di antaranya sebagai fotoprotektor, meningkatkan daya penglihatan dan juga dapat digunakan untuk menangani berbagai penyakit neurodegeneratif (Pratiwi & Limantara, 2008)

Astaksantin dan Manfaatnya di Bidang Pangan

Banyaknya manfaat dan aktivitas astaksantin tersebut mendorong dilakukannya berbagai penelitian terhadap produksi karotenoid untuk aplikasinya

sebagai zat aditif pada makanan dan pakan (Peto *et al.*, 1981 dalam Bhosale, 2001). Astaksantin sudah banyak diaplikasikan dalam makanan, misalnya pada daging salmon (Gambar 4).

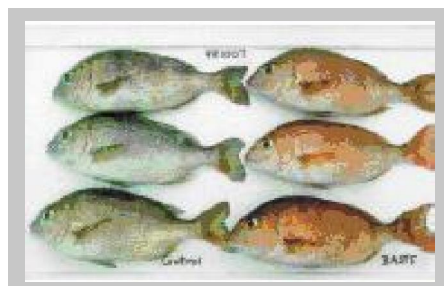
Penelitian pada skala laboratorium menunjukkan bahwa pemberian *Paracoccus* dalam pakan ikan kakap merah dapat meningkatkan kandungan karotenoid pada kulit berturut-turut sebesar 7,7 dan 2,0 kali lipat dibanding ikan yang diberi pakan komersil dan pakan yang mengandung astaksantin buatan. Adapun kandungan astaksantin pada kulit ikan kakap merah yang diberi pakan *Paracoccus* masing-masing lebih tinggi 6,2 dan 1,6 kali dibanding ikan yang diberi pakan yang tidak mengandung astaksantin dan yang diberi astaksantin buatan (Kurnia, 2007).

Produksi Massal Astaksantin

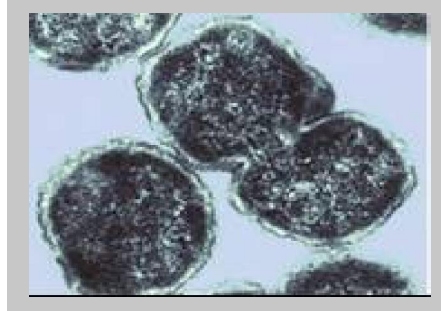
Berbagai macam sumber astaksantin untuk produksi massal telah banyak dilaporkan, di antaranya buah merah Irian, daun alfalfa, kulit buah tomat, wortel dan lain-lain. Namun produksi massal dari berbagai jenis bakteri laut belum banyak dilakukan. Hal ini merupakan prospek yang sangat menarik bagi industriawan maupun peneliti di Indonesia. Berbagai jenis bakteri laut dilaporkan mampu memproduksi astaksantin maupun jenis pigmen yang lain (Wusqy & Limantara, 2009). Salah satunya adalah *Paracoccus* sp. yang merupakan sumber pigmen baru yang dapat dijadikan sebagai bahan pewarna dalam pakan ikan baik dalam skala budidaya maupun untuk pemeliharaan ikan hias. Selain itu *Brevundimonas* sp.



Gambar 4. Daging salmon setelah pigmentasi dengan astaksantin (www.basf.com).



Gambar 5. Perbedaan warna ikan kakap yang tidak diberi astaksantin (*control*) dan yang diberi astaksantin dalam pakannya (*treatment*).



Gambar 6. Bakteri laut (*Paracoccus* sp.) (Kurnia, 2007).

(Nishida, 2005) dan *Agrobacterium aurantiacum* (Yokoyama *et al.*, 1994) juga telah diteliti sebelumnya mengandung astaksantin dan juga beberapa jenis pigmen yang lain. Namun sebagai bahan temuan baru, banyak kendala yang masih menjadi pertimbangan untuk produksi dan pemasaran dalam skala besar.

Agus Kurnia (2007) berhasil menggagas usaha dan mewujudkannya dengan membuat bakteri dengan gen termodifikasi (*gene modified bacteria*) atau lebih dikenal sebagai bakteri astaksantin untuk memproduksi astaksantin dalam jumlah lebih banyak dan murah. Bakteri ini dihasilkan dengan menyuntikkan gen pewarna ke bakteri *Escherichia coli* yang selanjutnya berkembangbiak dalam waktu singkat dan menghasilkan bakteri penghasil astaksantin. Selanjutnya seperti pada bahan pewarna lainnya, bakteri ini dibuat tepung dan dicampurkan ke dalam pakan. Meskipun secara teknis produksi bakteri astaksantin ini sudah berhasil ia lakukan dan harga yang murah juga sudah dapat tercapai, namun keraguan masyarakat awam untuk mengkonsumsi segala jenis produk pertanian yang berasal dari gen termodifikasi juga harus dipertimbangkan.

Melihat banyaknya potensi kekayaan ragam hayati yang dimiliki laut kita bukan hal yang tidak mungkin bagi kita untuk mendapatkan sumber-sumber astaksantin baru ataupun merekayasanya untuk memproduksi bahan pewarna ikan yang lebih murah. Kemampuan bakteri laut untuk menghasilkan pigmen alami telah memungkinkan penggunaan organisme tersebut sebagai salah satu alternatif sumber astaksantin alami dari laut, khususnya dalam penyediaan alternatif baik astaksantin maupun jenis pigmen alami lain yang berkelanjutan dan ramah lingkungan. Dalam hal produksi pigmen menggunakan mikroorganisme, sel mikroorganisme dapat dianggap sebagai “mesin biologi” penghasil pigmen (Wusqy & Limantara, 2009). Jika mikroorganisme telah berhasil dimurnikan dan dikultur dalam bentuk tunggal (monokultur) maka tidak perlu mengoleksinya lagi dari alam. Pertumbuhan mikroorganisme yang sangat cepat dapat menghemat waktu dan proses produksinya dapat berlangsung secara kontinu. Dibandingkan

dengan tumbuhan dan hewan, produksi dengan mikroorganisme lebih fleksibel dan dapat dengan mudah dikontrol. Hingga saat ini terdapat beberapa jenis bakteri laut yang masih dalam tahap pengembangan dan penelitian untuk dimanfaatkan sebagai sumber astaksantin. Pengembangan dan produksinya dalam skala industri pun merupakan prospek yang sangat menjanjikan. Kendatipun jika dilirik dari segi biaya yang sangat besar untuk mengeksplorasi dan merekayasa genetiknya, namun jika dibandingkan dengan hasil dan manfaat yang akan diperoleh, hal tersebut tidaklah menjadi kendala.

PENUTUP

Beberapa bakteri laut yang dilaporkan dapat memproduksi astaksantin di antaranya adalah *Brevundimonas*, *Paracoccus hundaenensis*, *Alcaligenes*, dan *Agrobacterium aurantiacum*. Gen-gen yang terlibat dalam seluruh proses biosintesis astaksantin di antaranya adalah gen *crtE*, *crtW*, *crtZ*, *crtY*, dan *crtI*. Sedangkan dua jenis enzim yang berperan dalam mengubah β -karoten menjadi astaksantin di antaranya adalah ketolase yang menggabungkan 2 gugus keto pada C-4 dan C-4' pada molekul β karoten (*CrtW*) dan hidroksilase yang memiliki 2 gugus hidroksil pada C-3 dan C-3' (*CrtZ*). Faktor-faktor yang berpengaruh pada biosintesis astaksantin di antaranya adalah oksigen, intensitas cahaya, keberadaan Fe dan adanya faktor kinetik. Di bidang kesehatan, astaksantin memiliki banyak fungsi di antaranya sebagai antioksidan, anti kanker, fotoprotektor, meningkatkan daya penglihatan dan juga dapat digunakan untuk menangani berbagai penyakit neurodegeneratif. Adapun di bidang pangan, astaksantin dapat dijadikan sebagai bahan pewarna makanan. Kemampuan bakteri laut untuk menghasilkan pigmen alami telah memungkinkan penggunaan organisme tersebut sebagai salah satu alternatif sumber astaksantin alami dari laut. Hingga saat ini terdapat beberapa jenis bakteri laut yang masih dalam tahap pengembangan dan penelitian untuk dimanfaatkan sebagai sumber astaksantin. Pengembangan dan produksinya dalam skala

industripun merupakan prospek yang sangat menjanjikan.

DAFTAR PUSTAKA

- An, G.H., Cho, M.H. and Johnson, E.A. 1999. Monocyclic carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). *J Biosci. Bioeng.* 88: 189–193.
- Anonymous. 2010. Astaxanthin gives farmed salmon its characteristic color. www.basf.com. Accessed on Mei 9, 2010.
- Bhosale and Prakash, B. 2001. *Studies on Yeast Rhodotorula, its carotenoids and their applications*. Thesis submitted to the University of Pune, India (February 2001) for the Degree of Doctor of Philosophy in Microbiology.
- Bouvier, F., Huguency, P., d'Harlingue, A., Kuntz, M., and Camara, B. 1994. Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *Plant J.* 6: 45–54.
- Britton, G., Jensen, L., Land, H., and Pfander. 1995. *Carotenoid*, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.
- Fraser, P. D., Miura, Y., and Misawa, N. 1997. In vitro characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes, *J. Biol. Chem.* 272, 6128–6135.
- Fraser, P.D. and Bramley, P.M. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* 43: 228–265
- Funk, C. and Croteau, R. 1994. *Arch. Biochem. Biophys.* 308, 258–266
- Hussein, G., Nakamura, M., Zhao, Q., Iguchi, T., Goto, H., Sankawa, U., and Watanabe, H. 2005. Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. *Biol Pharm Bull.* 28 (1): 47–52.
- Iwamoto, T., Hosoda, K., Hirano, R., Kurata, H., Matsumoto, A., Miki W., Kamiyama M., Itakura, H., Yamamoto, S. and Kondo, K. 2000. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin. *J. Atheroscler Thromb.*; 7 (4): 216–22.
- Johnson, E.A. and An, G.H. 1991. Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotechnol.* 11: 297–326.
- Jyonouchi, H., Sun, M. and Gross. 1995. Effect of carotenoids on in vitro immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells: astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, enhances in vitro immunoglobulin production in response to a T-dependent stimulant and antigen. *Nutr. Cancer* 23, 171–183.
- Kurihara, H., Koda, H., Asami, S., Kiso, Y. and Tanaka, T. 2002. Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress. *Life Sci.*, 70 (21): 2509–20.
- Kurnia, A. 2007. Lebih jauh tentang bahan pewarna ikan. www.beritaipetek.com. Diakses pada tanggal 9 Mei 2010.
- Lee, J. H., Kim, Y.S., Choi, T.J., Lee, W.J. and Kim, Y.T. 2004. *Paracoccus haeundaensis* sp. nov., a Gram negative, halophilic, astaxanthin-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1699–1702.
- Lodato, P., Alcaino, J., Barahona, S., Retamales, P., Jiménez, A. and Cifuentes, V. 2004. Study of the expression of carotenoid biosynthesis genes in wild-type and deregulated strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ex.: *Phaffia rhodozyma*). *Biol. Res.* 2004. 37: 83–93
- Lorenz, R. Todd. 2000. *Astaxanthin, Nature's Super Carotenoid*. BioAstin™ Technical Bulletin: 062.
- Lotan, T. and Hirschberg, J. 1995. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding β -C-4-oxygenase, that converts β -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *FEBS Lett* 1995. 364: 125–128
- Mannisto, S., Smith-Warner, S.A., Spiegelman, D., Albanes, K., Anderson, Brandt, P.A., Cerhan, J.R., Colditz, G., Feskanich, D., Freudenheim J.L., Giovannucci, E., Gohlbohm, R.A. and Graham, S. 2004. Dietary carotenoids and risk of lung cancer in a pooled analysis of seven cohort studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13: 40–48
- Martín, J.F., Gudiña, E. and Barredo, J.L. 2008. Conversion of β -carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein. *Microbial Cell Factories.* 4286–4296
- Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, Ohtani, T., and Miki, W. 1995. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster at the gene level. *J. Bacteriol.* 177, 6575–6584.
- Nishida, Y., Adachi, K., Kasai, H., Shizuri, Y., Shindo, K., Sawabe, A., Komemushi, S., Miki, W., and Misawa, N. 2005. Elucidation of a carotenoid biosynthesis gene cluster encoding a novel enzyme, 2,2'- β -hydroxylase, from *Brevundimonas* sp. strain SD212 and combinatorial biosynthesis of new or rare xanthophyll. *App. Env. Micr.* 71(8): 4286–4296
- Pogson, B., McDonald, K.A., Truong, M., Britton, G., and Della, P. 2003. Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is, not essential for photosynthesis in higher-plants. *Plant Cell* 8. 1627–1639.
- Pratiwi, R. and Limantara, L. 2008. Astaxanthin dan Kesehatan Manusia. *Prosiding Seminar Nasional Pigmen 2008 MB UKSW*. Salatiga. ISBN: 979-1098-16-4
- Visser, H., van Ooyen, A.J.J., and Verdoes, J.C. 2003. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS Yeast Res* 2003, 4: 221–231.
- Wusqy, N. and Limantara, L. 2009. Bakteri Laut: Mesin Biologi Penghasil Pigmen. *TROBOS Edisi Desember* 2009.
- Yokoyama, A., Izumida, H., and Miki, W. 1994. Production of astaxanthin and 4-ketozeaxanthin by the marine bacterium, *Agrobacterium aurantiacum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 184221844.
- Yokoyama, A., Miki, W., Izumida, H., and Shizuri, Y. 1996. New trihydroxyketo-carotenoids isolated from an astaxanthin-producing marine bacterium. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 200–203.
- Zhu, Y.S. and Hearst, J.E. 1986. Regulation of expression of genes for light harvesting antenna proteins LH-1 and LH-II; reaction center polypeptides RC-L, RC-M and RC-H and enzymes of bacteriochlorophyll and carotenoid biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus* by light and oxygen. *Biochemistry*. 83: 7613–7617.