

Revisión bibliográfica

Condiciones de producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*: Revisión bibliográfica 2003-2013

Production conditions of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: Literature review 2003-2013

Kiryag Jearim Hernández Morales, María Eugenia Pérez Morales, Carmen Jáuregui Romo, Luis Alberto Alcántara Jurado, Lilia Angélica Hurtado Ayala

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, México

Resumen

Durante los últimos años las microalgas han adquirido especial interés, debido a que son productores importantes de compuestos de alto valor agregado. *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) es una de las fuentes más importante de astaxantina, tiene un gran interés comercial debido a su poderosa actividad antioxidante. Se realizó una revisión bibliográfica de 15 artículos científicos, en donde se evaluaron diferentes condiciones de cultivo y factores de estrés con el propósito de mejorar la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*. Se encontró una heterogeneidad en los factores estudiados así como en el diseño experimental planteado. La intensidad de luz fue el factor más importante y el que se evaluó con mayor frecuencia en los estudios. Un diseño adecuado de fotobiorreactor junto con la combinación óptima de factores permite mejorar las condiciones de cultivo y producción de astaxantina.

Abstract

During recent years, microalgae have acquired special interest, since they are important producers of compounds with high added value. *Haematococcus pluvialis* is the most important source of astaxanthin, which is of great commercial interest due to its powerful antioxidant activity. A literature review of 15 scientific articles was carried out, these studies evaluated different culture conditions and stress factors in order to improve the accumulation of astaxanthin in *H. pluvialis*. Heterogeneity was found in the studied factors as well as the proposed experimental design. The light intensity was the most important factor used in the analyzed studies. An appropriate photobioreactor design with the optimal combination of factors improves the conditions of culture and production of astaxanthin.

Palabras clave: *Haematococcus pluvialis*, astaxantina, producción de astaxantina, microalga.

Key words: *Haematococcus pluvialis*, astaxanthin, astaxanthin production, microalgae.

Correspondencia:

QFB. Kiryag Jearim Hernández Morales
Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería
Universidad Autónoma de Baja California
Calle Anáhuac # 1231, colonia las Torres Otay
CP 22470, Tijuana, B.C. México
Tel. 01 (664) 359 4994
e-mail: hernandezmoralesk@uabc.edu.mx,
kiryakhm@gmail.com

Fecha de recepción: 05 de Agosto de 2014

Fecha de recepción de modificaciones: 01 de abril de 2015

Fecha de aceptación: 27 de abril de 2015

Introducción

Astaxantina (3, 3'-dihidroxi- β , β' - caroteno- 4, 4'- diona) es una molécula compuesta de una cadena larga de 40 carbonos con doble ligaduras y dos grupos hidroxilo libres en sus anillos terminales.¹ Astaxantina es uno de los antioxidantes más importantes² ya que presenta varias ventajas con respecto a otros carotenoides, por ejemplo: mayor estabilidad, alto poder antioxidante (diez veces mayor que β -caroteno y 500 veces más que α -tocoferol), cruza fácilmente la barrera hematoencefálica y es un excelente pigmento.³

Debido a la estructura química (figura 1), la astaxantina cruza la membrana lipídica de las células, protegiendo la superficie interna y externa de la oxidación.^{4,5} La astaxantina tiene una poderosa actividad antioxidante⁶ y ha sido evaluada eficientemente en modelos animales y humanos.^{7,8}

Se han efectuado varios estudios en donde se analizan los beneficios de la astaxantina, entre los resultados más significativos se encuentra un efecto antimicrobiano en contra de *Helicobacter pylori*,⁹ dosis de 25 mg/kg protegió contra fármacos (naproxeno) que inducen úlcera gástrica en ratas,¹⁰ se evaluaron dosis de 3.6 mg diarios por dos semanas consecutivas, los resultados demostraron mantener los niveles óptimos de LDL y HDL en la sangre,¹¹ 2 mg/kg mejoró el metabolismo de glucosa y ayudó a prevenir la resistencia a insulina en ratas con una dieta rica en fructosa.¹² Así también, presentó una importante actividad anticancerígena¹³ y redujo significativamente la presión sistólica en ratas hipertensas.¹⁴ Curek et al.¹⁵ observaron que administrar 5 mg/kg/día de astaxantina durante 14 días redujo considerablemente lesiones hepatocelulares en ratas después de un daño isquémico. Por todo esto, la astaxantina se está utilizando como principio activo en productos nutraceuticos principalmente por vía oral para prevenir y ayudar a tratar enfermedades degenerativas, tales como cáncer, enfermedades de la piel y cardiacas.^{11,16}

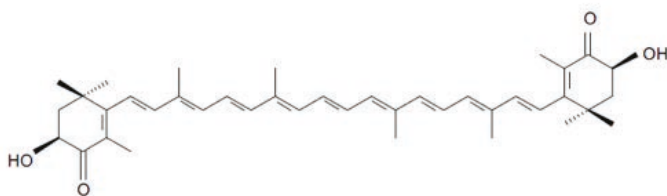


Figura 1. Estructura de astaxantina¹⁷

Las microalgas son una fuente importante de sustancias de alto valor agregado tales como ácidos grasos y carotenoides.¹⁸ *H. pluvialis* es una microalga biflagelada unicelular perteneciente a la clase Chlorophyceae,¹⁹ cuando *H. pluvialis* es sometida a

condiciones de estrés, como intensidades altas de luz,²⁰ deficiencia de nutrientes,²¹ altas concentraciones de sales,²² baja y alta temperaturas²³ la microalga pierde la motilidad y cambia a una forma esférica. Después de 24 horas de estrés las células se enquistan, en esta etapa aumentan de tamaño y desarrollan una pared celular resistente.²⁴ *H. pluvialis* sobresale por su habilidad para sintetizar grandes cantidades de astaxantina, siendo una de las fuentes de producción más prometedora de este antioxidante,²⁵ llegando a producir cerca del 4 % de peso seco.^{2,26} Sin embargo, a pesar de ser una opción con gran potencial, todavía se requiere mejorar los parámetros de operación para optimizar los rendimientos, así como, bajar los costos de producción, con el propósito de hacer más competitiva esta fuente natural.²⁷

Un factor técnico importante en este campo es el método de cuantificación utilizado. Aunque el método de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) es el método más exacto, tiene sus inconvenientes con respecto al tiempo implementado para efectuar los análisis.²⁸ En contra posición, el método de espectrofotometría es un método rápido, sin embargo, carece de selectividad, ya que las absorbancias de compuestos similares tienden a traslaparse. Un método alternativo que elimina el problema de absorbancias traslapadas es la espectrofotometría derivada.²⁹ Este método se basa en una transformación matemática de los cruces en cero de los espectrogramas en espectros derivados, permitiendo una resolución rápida, sensible y precisa de múltiples componentes en una muestra.³⁰ Liu et al, (2011), desarrollaron y validaron un método de espectrofotometría derivada. Determinaron cómo la clorofila y el beta caroteno interfieren en la cuantificación de astaxantina. Los parámetros de calidad calculados fueron exactitud, precisión y límite de detección. Para tener valores de referencia, y poder hacer la comparación estadística, también realizaron la cuantificación por HPLC. Los experimentos arrojaron resultados muy similares entre ambos métodos, por lo que se concluye que no existe diferencia significativa.²⁸

Durante las últimas décadas se han estudiado varios factores estresantes y sus combinaciones en la síntesis de astaxantina utilizando *Haematococcus pluvialis*,³¹ se ha planteado que utilizar fotobiorreactores adecuadamente diseñados mejora los procesos de producción.³²

Nguyen (2013), reportó un estudio comparativo de la producción de astaxantina natural obtenida a partir de microorganismos y astaxantina sintética obtenida por medio de procesos químicos, y en donde se incluyeron estudios relacionados con el mejoramiento en la acumulación de astaxantina por *H. pluvialis* (de 1991 a 2012), en éstos la mayor concentración de astaxantina fue de 357 mg/L y se obtuvo utilizando un fotobiorreactor de doble región.³³

Por otra parte, Lababpour et al. (2004), analizaron 5 artículos y reportaron resultados de concentración de astaxantina en *H. pluvialis* a diferentes escalas de cultivo. Sin embargo, no se encontró una revisión sobre las condiciones de estrés óptimas en la producción de astaxantina a partir de *H. pluvialis* publicada hasta 2013.

El propósito de este estudio fue realizar una revisión bibliográfica de estudios que evaluaron diferentes factores de estrés y determinaron los mejores niveles de operación y rendimiento en la producción de astaxantina, publicados en las bases de datos de MEDLINE/Pub-Med, SciELO, y EBSCO, de 2003 a 2013.

Descripción de artículos

Se revisaron todos los artículos originales encontrados en inglés y español publicados en las bases de datos de MEDLINE/PubMed, SciELO y EBSCO de 2003 a 2013, de estudios sobre factores de estrés para optimizar la producción de astaxantina. Los criterios de inclusión fueron: *Haematococcus pluvialis*, optimización de producción de astaxantina y factores de estrés. Se realizó la búsqueda con las palabras clave: “*Haematococcus pluvialis*”, “astaxantina”, “producción de astaxantina”, “astaxanthin”, “astaxanthin production”. En la búsqueda electrónica se encontraron 5120 artículos sobre *H. pluvialis*. Al aplicar los criterios de inclusión y el rango de fecha de publicación de 2003 a 2013, quedaron 30 artículos potenciales, de los cuales se analizó el resumen de cada uno y se eliminaron 15 que no cumplieron con los criterios de inclusión, por lo que quedaron 15 estudios para el análisis y evaluación en esta revisión (Fig. 2).

En esta revisión bibliográfica se incluyeron 15 estudios. Se analizaron principalmente los factores de estrés medioambientales y bioquímicos que tuvieron un efecto en la producción de astaxantina por *H. pluvialis*. Estos estudios se realizaron en México,³⁴ España,³⁸ China,⁴² Turquía⁴⁹ y Hong Kong;⁵⁰ uno en cada país; cuatro en Corea del Sur^{40,41,52,54} y seis artículos se desarrollaron en Japón.^{35,37,39,45,46,48} El factor más evaluado fue la intensidad de luz seguida por la modificación de los componentes del medio de cultivo. En tres artículos se propone un diseño específico de fotobiorreactor como principal factor.^{41,45,46} En un artículo se evaluó la fase del ciclo de vida más propicia para ser transferida a la etapa de inducción de astaxantina.⁵² Katsuda et al., efectuaron una serie de investigaciones donde se evaluó el efecto de la longitud de onda (azul) utilizando lámparas LEDs.^{34,48} Hong et al. (2012), se enfocaron en obtener una cepa fotosensible y determinaron el efecto provocado por intensidades moderadas y altas.⁵⁴ El método de cuantificación más utilizado es el de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplado a un detector de ma-

triz de fotodiodos y una columna de fase reversa C18.^{34,35,37,38,39,45,46,48,50,54} Sin embargo, también se usó espectrofotometría UV-visible.^{40,41,42,49,52} Los autores reportan el uso de curvas de calibración con estándares para el cálculo de las concentraciones de pigmentos. Enseguida se muestra una breve descripción de los estudios incluidos.

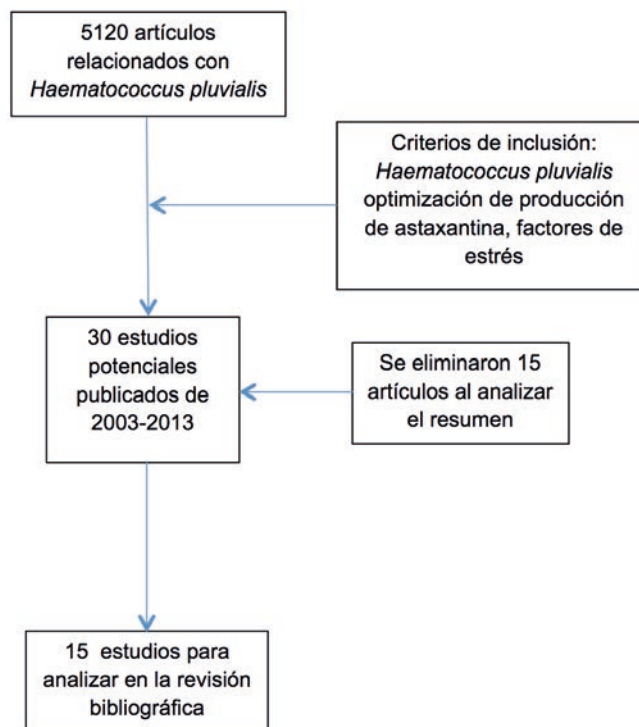


Figura 2. Diagrama de flujo de la búsqueda electrónica y selección de artículos.

Katsuda et al. (2004),³⁴ estudiaron el efecto de diferentes longitudes de onda, (625, 525, 470, 410, 380 nm) a diferentes intensidades de luz en el crecimiento celular y acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*, la fuente de luz utilizada provino de lámparas de LEDs (diodos emisores de luz), estos tienen como característica una emisión espectral estrecha. Los resultados obtenidos demuestran que utilizar luz roja (625 nm) en el cultivo permitió aumentar la densidad celular, mientras que usar luz azul (380-470 nm) indujo un cambio morfológico en la célula y mejoró la acumulación de astaxantina. El método de cuantificación del pigmento fue por cromatografía líquida de alta eficiencia. El equipo utilizado fue un sistema LC-10 Shimadzu equipado con una columna de fase reversa Cosmosil 5C18-MS-II, 4.6 mm x 150 mm. La fase móvil fue metanol a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las lecturas de absorbancia se realizaron con un detector de matriz de fotodiodos (SPD-M10A, Shimadzu). Los autores realizaron una curva de calibración con estándares para la cuantificación de los pigmentos.

Dominguez-Bocanegra *et al.* (2004),³⁵ realizaron un estudio para determinar el efecto de los siguientes factores medioambientales: intensidad de luz, aireación y nutrientes en el crecimiento celular y producción de astaxantina. El diseño experimental planteado se enfocó en realizar una serie de combinaciones de los factores, en donde la intensidad de luz se mantuvo constante ($177 \mu\text{mol fotón/m}^2\text{/s}^{-1}$), una vez obtenidos los resultados se ejecutó el análisis de ANOVA y se procedió a determinar la mejor combinación. De acuerdo con el análisis de varianza se encontró un efecto significativo en los tres factores evaluados ($p < 0.001$) se realizó el análisis de comparación múltiple y se decidió trabajar con medio BAR a una nueva intensidad de $345 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en los siguientes estudios para la evaluación de la producción de astaxantina. Con base en los resultados experimentales se concluyó que las condiciones óptimas para el crecimiento celular son: medio BBM a 28°C con luz continua fluorescente blanca ($177 \mu\text{mol fotón/m}^2\text{/s}$) y aireación continua ($1.5\% \text{CO}_2$). Asimismo, la combinación de medio BAR suplementado con 1 g/L de acetato de sodio, iluminación continua ($345 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y aireación condujeron a la máxima producción de astaxantina. Para la cuantificación de astaxantina implementaron el método de Jian-Ping *et al.* (1997).³⁶ El cual se requiere de un HPLC acoplado a un detector de matriz de fotodiodos, una fase móvil que consiste de metanol (69%), acetonitrilo (11.5%) y agua (2.5%). La velocidad de flujo fue de 1 ml/min . Los autores no especifican el tipo de columna empleada. Se utilizó un estándar comercial de astaxantina marca Hoffmann-La Roche para la curva de calibración.

Lababpour *et al.* (2004),³⁷ desarrollaron un estudio para determinar el efecto que presentan los siguientes factores: concentración de nutrientes, pH, método de adición de nutrientes e iluminación con luz roja y azul (LEDs): así como, el efecto de sus interacciones en la concentración y acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*. Para la inducción de astaxantina, la concentración del medio de cultivo fue de medio 2x, pH de 6.8, intensidad de luz roja ($8 \mu\text{mol fotón/m}^2\text{/s}$) para posteriormente cambiar a luz azul ($12 \mu\text{mol fotón/m}^2\text{/s}$). Los resultados revelan que el cambio de longitud de onda afectó positivamente la acumulación de astaxantina alcanzando concentraciones de $76 \mu\text{g/ml}$, valor mucho mayor que el reportado por Katsuda *et al.* (2004) que fue de $42 \mu\text{g/mL}$. El método de cuantificación del pigmento fue por cromatografía líquida de alta eficiencia. El equipo utilizado fue un sistema LC-10 Shimadzu equipado con una columna de fase reversa Cosmosil 5C18-MS-II, $4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$. La fase móvil fue metanol a una velocidad de flujo de 1 ml/min . Las lecturas de absorbancia se efectuaron en 470 nm y 680 nm y se realizaron con un detector de matriz de fotodiodos (SPD-M10A, Shimadzu). Los autores realizaron una curva de calibración con estándares para la cuantificación de los pigmentos.

Orosa *et al.* (2005),³⁸ llevaron a cabo un estudio para determinar las concentraciones óptimas de nitrato de sodio, acetato de sodio y malonato de sodio, con el propósito de mantener el crecimiento celular y maximizar la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*. De acuerdo con el diseño experimental se determinó que a concentraciones de 0.25 , 0.5 , 0.75 y 1.0 g/l de nitrato, la densidad celular aumentó en forma lineal, en concentraciones de 0.15 g/l se presentó una disminución en la proporción de clorofila a/carotenoides llegando a un valor de 1 en el día 15 del experimento, el cual es un buen indicador fisiológico de deficiencia de nitrato en la célula. Con respecto a acetato y malonato, concentraciones de 2% provocaron inhibición en la tasa de crecimiento celular. Sin embargo, una concentración de 0.25% causó un aumento en la tasa de crecimiento celular y acumulación de astaxantina por célula. Los resultados obtenidos revelan que concentraciones bajas de nitrato de sodio, acetato de sodio y malonato de sodio permiten mantener la tasa de crecimiento constante y a la vez promueven la síntesis de carotenoides.

La cuantificación de los carotenoides se realizó con un equipo de HPLC marca Hewlett Packard acoplado a un detector de matriz de fotodiodos y una columna de fase reversa Hypersil C₁₈ $25 \times 4 \text{ mm}$. La fase móvil consistió en A (agua), B (metanol) y C (acetona). El gradiente se corrió de la siguiente manera: $0 \text{ min } 9\% \text{ A}, 76\% \text{ B}, 15\% \text{ C}$; $9 \text{ min } 5\% \text{ A}, 45\% \text{ B}, 50\% \text{ C}$; $15 \text{ min } 4\% \text{ A}, 38\% \text{ B}, 58\% \text{ C}$; $17 \text{ min } 3\% \text{ A}, 27\% \text{ B}, 70\% \text{ C}$; $22 \text{ min } 3\% \text{ A}, 27\% \text{ B}, 70\% \text{ C}$; $25 \text{ min } 100\% \text{ C}$; $26 \text{ min } 100\% \text{ C}$, la velocidad del flujo fue de 1 ml/min . Las longitudes de onda programadas fueron 444 y 476 nm . Se utilizaron estándares de b-caroteno (Sigma) y astaxantina, cantaxantina y equinenona (F. Hoffman. La Roche Ltd.) para la curva de calibración.

Lababpour *et al.* (2005),³⁹ realizaron un estudio para evaluar el efecto del método de alimentación (*fed-batch*) e iluminación con luz azul (LEDs) en la producción de astaxantina en *H. pluvialis*. La adición de nutrientes por el método *fed-batch* mantuvo la actividad fisiológica de las células y el cambio de luz de roja a azul aceleró la acumulación de astaxantina. Por otra parte valores de pH superiores a 9.5 suprimen la síntesis de carotenoides. Se comparó el resultado con un estudio realizado previamente donde se utilizó el método de reemplazo de medio y el rendimiento obtenido es superior al reportado, por lo que se concluye que el método de alimentación *fed-batch*, luz azul y no ajuste de pH son parámetros efectivos para la producción de astaxantina en fotobiorreactores. La concentración de astaxantina se cuantificó por medio de un sistema HPLC (LC-10; Shimadzu) equipado con una columna de fase inversa (Cosmosil 5C18-ms-II, $4.6 \times 150 \text{ mm}$). La fase móvil utilizada fue metanol a una velocidad de flujo de $1 \text{ cm}^3\text{/min}$. La longitud de onda programada fue 470 y 680 nm utilizando un detector de matriz de fotodiodos (SPD-M10A; Shimadzu).

Kim et al. (2006),⁴⁰ plantearon el uso de lámparas intermitentes como fuente de luz, con el propósito de aumentar la producción de astaxantina en *H. pluvialis*, las pruebas experimentales se diseñaron para evaluar el efecto de luz intermitente localizadas tanto en el interior como en el exterior del fotobiorreactor a intensidades de 65.6 y 16.4 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ respectivamente. La fuente de luz exterior, obtuvo rendimientos por fotón por lo menos 60 % mayor que la luz continua, mientras que la luz interior presentó un incremento en el rendimiento por fotón de 400 %. Se observó que a pesar de que las intensidades aplicadas son bajas, hubo resultados positivos en la acumulación de astaxantina basándose en el rendimiento por fotón utilizado, ante esto, utilizar intensidades altas de luz intermitente de preferencia localizadas en el interior del fotobiorreactor podría mejorar de manera positiva la acumulación de astaxantina. La cuantificación de las xantofilas se realizó con un espectrofotómetro modelo HP8453B, Hewlett-Packard, el disolvente de extracción fue acetona. Realizaron una curva de calibración con estándares de astaxantina sintética (A9335, Sigma-Aldrich). Los resultados de concentración de astaxantina fueron calculados con la ecuación $\text{mg/l} = 0.0045 \times \text{Densidad}_{475}$.

Suh et al. (2006),⁴¹ plantearon el uso del fotobiorreactor de doble región. El propósito del diseño fue mantener simultáneamente el crecimiento celular en la región interna y estimular la síntesis de astaxantina en la región externa del fotobiorreactor. El objetivo fue simplificar el proceso de producción de dos etapas de astaxantina a partir de *H. pluvialis*. De acuerdo con el diseño experimental, las condiciones de estrés fueron intensidad alta de luz y deficiencia de nitrógeno. La máxima acumulación de astaxantina fue de 357 mg/ml en la región exterior del fotobiorreactor, mientras que, la concentración celular en la región interior fue de 4.0×10^5 cel/mL. Los resultados demuestran que el diseño del fotobiorreactor estimuló la producción de astaxantina utilizando altas intensidades de luz y deficiencia de nitrógeno y al mismo tiempo mantuvo el crecimiento celular en la región interna utilizando la misma fuente de luz. Para la cuantificación de astaxantina se utilizó un espectrofotómetro modelo HP8453B, Hewlett Packard.

He et al. (2007),⁴² llevaron a cabo un estudio en el cual se enfocaron en evaluar el efecto de la combinación de intensidad de luz y deficiencia de azufre, hierro y fosfato en el cultivo de *H. pluvialis* para la producción de astaxantina. De acuerdo al diseño experimental, se utilizaron dos medios de cultivo diferentes, las variables de pH y temperatura se mantuvieron constantes. Para la determinación de astaxantina por célula a intensidad de luz de 100 $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$ se utilizó medio BG₁₁, los resultados indicaron que el medio en deficiencia de azufre fue el que acumuló la mayor concentración de astaxantina. Para la determinación de carotenoides por célula se utilizó la mezcla de medio Euglena Gracilis y Jaworski (1:1),

las combinaciones experimentales se describen en la tabla 1, de acuerdo con los resultados, al décimo primer día en deficiencia de azufre se presentó la mayor acumulación de carotenoides por célula. Con base en los resultados obtenidos, la deficiencia de azufre generó un ambiente celular estresante superior que los demás factores evaluados. El método de cuantificación fue el planteado por Boussiba y Vonshak (1991).⁴³ Utilizaron un espectrofotómetro (UV-1601, Shimadzu). La longitud de onda programada fue de 492 nm. La cantidad de astaxantina se calculó aplicando el coeficiente de absorción de 2220 en dimetilsulfóxido de acuerdo con Steinbrenner y Linden (2001).⁴⁴

Ranjbar et al. (2008),⁴⁵ realizaron un estudio para evaluar el efecto que causa la interacción entre la reducción de nutrientes por medio de dilución e intensidad de luz alta en la acumulación de astaxantina por *H. pluvialis*, se ejecutaron 4 corridas a diferentes condiciones de cultivo en un fotobiorreactor de columna de burbujas, durante las primeras 300 horas a los cultivos se les adicionó medio inorgánico estándar concentrado (*fed-batch*). Después de las 300 horas de cultivo, a las corridas dos, tres y cuatro se les extrajo la mitad de cultivo y se sustituyó por agua esterilizada, en la corrida cuatro, la intensidad de luz se disminuyó a 21.5 $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$. De acuerdo con los resultados obtenidos, la aplicación del método *fed-batch* junto con iluminación a 48.5 $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$ presentó el mejor efecto en el crecimiento celular, mientras que una reducción en la concentración de nitratos por debajo de 4 mM e intensidad de 48.5 $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$ dio como resultado los mejores valores de astaxantina. La cuantificación de astaxantina se llevó a cabo por medio de HPLC (LC-10; Shimadzu), una columna de fase inversa (Cosmosil 5C18-MS-II, 4.6 mm x 150 mm) la fase móvil consistió en metanol a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El equipo fue acoplado a un detector UV-visible (SPD-10AV). La concentración de astaxantina se determinó por medio de una curva de calibración preparada con muestras de astaxantina libre.

Ranjbar et al. (2008),⁴⁶ efectuaron un estudio para determinar el efecto que presenta la interacción entre altas intensidades de luz, deficiencia de nitrógeno y el tipo de circulación del líquido en el cultivo de *H. pluvialis* y la acumulación de astaxantina. El tipo de fotobiorreactor usado fue *airlift* (tubo interno tipo bucle). Los resultados se compararon con los obtenidos en otro estudio realizado por los mismos autores,⁴⁵ donde se utilizó un fotobiorreactor de columna de burbujas, las condiciones de cultivo y parámetros de estrés son similares al estudio previo. Con los resultados se observó que una reducción en la concentración de nitratos por abajo de 4 mM e intensidad de 48.5 $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$ mejoró un 16 % la acumulación de astaxantina. Posteriormente se aplicó una intensidad de 94.3 $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$, la cual aumentó 35 % la concentración de astaxantina después de las 720 horas. De acuerdo con los resultados se concluyó que el diseño del fotobiorreactor *airlift*

incrementó la densidad celular y la producción de astaxantina significativamente. La cuantificación de astaxantina se llevó a cabo por medio de HPLC (LC-10; Shimadzu), una columna de fase inversa (Cosmosil 5C18-MS-II, 4.6 mm x 150 mm) la fase móvil consistió en metanol a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

El equipo fue acoplado a un detector UV-visible (SPD-10AV). La concentración de astaxantina se determinó por medio de una curva de calibración preparada con muestras de astaxantina libre. el procedimiento se basó del método de Yuan y Chen, (1998).⁴⁷

Tabla 1. Parámetros de operación y factores de estrés bioquímicos

Referencia	Diseño de fotobiorreactor	Medio de cultivo	Volumen de cultivo (ml)	Variables de estrés	Valor de variables	Tiempo de cultivo (días)	Variables óptimas acumulación de astaxantina	Densidad celular máxima	Concentración máxima de astaxantina
Domínguez-Bocanegra et al. (2004) México ³⁵	Matraz Erlenmeyer 1000 ml	Basal Bold	700	Medio de cultivo BBM, BG-11, FAB, BAR Intensidad de luz Aireación Ciclo Luz/Oscuridad	177 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ 345 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ 1.5% CO_2 12/12 h 24/0 h	7 19	Medio BAR, 345 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, no aireación, ciclo Luz/oscuridad 24/0 horas	35 x10 ⁴ cel/ml	98 mg/g cel
Lababpour et al. (2004) Japón ³⁷	Recipiente de vidrio, altura 6.5 cm, ancho 5.0 y profundidad 2.5 cm	Kobayashi	55	Concentración de medio pH Intensidad de luz: Luz roja Luz azul Método de alimentación	Medio 2x 6.8 8 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ 12 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ Reemplazo de medio	12.5	Medio 2x. pH 6.8, luz roja (8 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$) cambio a luz azul (12 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$) a los 6 días de cultivo	1.5 mg/cm ³	76 $\mu\text{g/ml}$
Orosa et al. (2005) España ³⁸	Mini reactor	Basal Bold modificado + ALGAL 1	400	Nitrato de sodio Acetato de sodio Malonato de sodio Intensidad de luz	0, 0.15, 0.25, 0.5, 0.75, 1 g/l 0, 0.25, 0.5, 1, 2%(p/v) 0, 0.25, 0.5, 1, 2%(p/v) 68.25 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$	15	0.15 g/l 0.25% 0.25%	ND	5.41±0.46 pg/cel 17.59±0.73 pg/cel 8.62±0.11 pg/cel
Lababpour et al. (2005) Japón ³⁹	Recipiente de vidrio, altura 6.5 cm, ancho 5.0 y profundidad 2.6 cm	Kobayashi	50	Concentración de medio pH Intensidad de luz: Luz roja Luz azul Método de alimentación	Medio 10x 6.8 – 11.0 8 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ 12 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ Fed-batch	20	Medio 10x, no ajuste de pH, luz roja (8 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$) cambio a luz azul (12 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$)	1.2mg/cm ³	70 $\mu\text{g/ml}$
Suh et al. (2006) República de Corea ⁴¹	Fotobiorreactor de doble región	Basal bold fortificado	ND	Intensidad de luz Deficiencia de nitrógeno	40±3 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ (región interior) 770±20 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ (región exterior)	26	Región exterior, 770 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ Y deficiencia de nitrógeno	4.0 x 10 ⁵ cel/ml (región interior)	357 mg/l
He et al. (2007) China ⁴²	Recipiente de 250 ml	BG ₁₁ Euglena Gracilis Jaworski	100	Intensidad de luz Medio libre de azufre, hierro y fosfatos	15 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ 100 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ 150 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$	4	Medio BG11 en deficiencia de azufre + 100 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$	ND	25 pg/cel
Ranjbar et al. (2008) Japón ⁴⁵	Columna de burbujas, 69 mm diámetro interno y 430 mm largo	Inorgánico estándar	1000	Intensidad de luz Dilución de medio de cultivo	21.5 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ 48.5 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ A las 300 horas de cultivo, Corrida 1 no se diluye medio de cultivo Corrida 2, 3 y 4 extracción de la mitad de medio y adición de agua esterilizada	33	Corrida 3 Dilución del medio de cultivo (nitratos menor de 4 mM) Intensidad de luz 48.5 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$	3.5x10 ⁶ cel/ml	390 mg/l
Ranjbar et al. (2008) Japón ⁴⁶	Airlift 1.0 l	Inorgánico estándar	1000	Intensidad de luz Dilución de medio de cultivo	21.5 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ 48.5 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ 94.3 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ A las 300 horas de cultivo	33	Dilución del medio de cultivo (nitratos menor de 4 mM) Intensidad de luz 48.5 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ 94.3 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$	4.0x10 ⁶ cel/ml	460 mg/l (48.5 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$) 600 mg/l (94.3 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$)
Imamoglu et al. (2009) Turquía ⁴⁹	Matraz Erlenmeyer 1000 ml	Rudic	600	Intensidad de luz Concentración de nutrientes	445 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ 546 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ RM, libre de nitratos, libre de fosforo, libre de NP y agua destilada	14	Agua destilada CO_2 + 546 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$	ND	29.62 mg/g
Choi et al (2011) República de Corea ⁵²	Recipiente	Medio óptimo para <i>Haematococcus</i>	500	6 inóculos a diferentes fases de crecimiento Intensidad lumínica Adición de acetato Deficiencia de nitrógeno	inóculo días 1 4 2 11 3 18 4 25 5 29 6 36 500 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ 15 mM	36	Inóculo 6 de 36 días + intensidad de luz a 500 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ + adición de acetato 15 mM.	ND	26 mg/l
Hong et al. (2012) Corea del sur ⁵⁴	Matraz Erlenmeyer 250ml	NIES	120	Intensidad de luz Cepa modificada	70 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ 150 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ Cepa fotosensible	20	70 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ + Cepa fotosensible	3.7 x10 ⁵ cel/ml	62.39 mg/l

ND=No disponible.

Tabla 2. Parámetros de operación y factores de estrés medioambientales

Referencia	Diseño de fotobiorreactor	Medio de cultivo	Volumen de cultivo (ml)	Variables de estrés	Valor de variables	Tiempo de cultivo (días)	Variables óptimas de acumulación de astaxantina	Densidad celular máxima	Concentración máxima de astaxantina
Katsuda et al. (2004) Japón ³⁴	Recipiente de vidrio, altura 6.5 cm, ancho 5.0 y profundidad 2.5 cm	Kobayashi	55	Rojo (625 nm), verde (525 nm), azul (470 nm), azul-purpura (410 nm), purpura (380 nm) y blanca	2.8 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ 8.0 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ 12.0 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$	12	Densidad celular Luz roja: 8.0 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ Ac. astaxantina Luz azul: 11.0 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$	0.8 mg/ml	42 $\mu\text{g/ml}$
Kim et al. (2006) República de Corea ⁴⁰	Columna de burbujas 2 l. 4.25 cm de diámetro y 58 cm de largo	Basal Bold modificado	2000	Luz continua Luz continua+intermitente Luz intermitente	220.6 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ 316.4 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ 155+65.6 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ 300+16.4 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ 65.6 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ 16.4 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$	30	Luz intermitente interna a 16.4 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$	3x10 ⁵ cel/ml	99 mg/ml
Katsuda et al. (2008) Japón ⁴⁸	Recipiente de vidrio, altura 6.5 cm, ancho 5.0 y grosor 2.6 cm	Kobayashi	55	Intensidad de luz Frecuencia de luz	12, 18 y 36 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ 0.001 a 200 Hz	12	18 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ y frecuencia por debajo de 1 Hz	4.4 x10 ⁵ cel/ml	35 $\mu\text{g/ml}$
Wu et al. (2010) Hong Kong ⁵⁰	Caja Petri 150 mm Recipiente cónico 250 ml	Basal de crecimiento	250	Intensidad de radiación UV-B Tiempo de exposición	3, 5, y 9 W/m ² 20, 60 y 100 min	7	Intensidad de UV-B, 5 W/m ² por 60 minutos	0.41 g/l	3.20 \pm 0.29 mg/g

ND=No disponible.

Katsuda *et al.* (2008),⁴⁸ investigaron el efecto de la frecuencia e intensidad de luz en la síntesis de astaxantina en *H. pluvialis*. El efecto de luz intermitente dio mejores resultados que luz continua. De acuerdo con los resultados, la concentración final de astaxantina en luz intermitente a 18 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ y una intensidad de luz incidente de 12 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ fue de 35 $\mu\text{g/ml}$ siendo superior a la obtenida en condiciones de luz continua de 12 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$, el cual fue aproximadamente de 27 $\mu\text{g/ml}$. El tiempo de cultivo fue de 300 horas. Por lo tanto se determinó la utilidad de luz intermitente en el cultivo de microalgas. La cuantificación se realizó con un HPLC (LC-10; Shimadzu), con una columna de fase reversa (Cosmosil 5C18-MS-II, 4.6 x 150 mm). Se utilizó metanol como fase móvil a una velocidad de flujo de 1 mL/min. El equipo se acopló a un detector UV-visible (SPD-10AV; Shimadzu). Además se reporta que se realizó una curva de calibración usando estándares de astaxantina marca Sigma Aldrich. El procedimiento fue siguiendo el método de Yuan y Chen (1998).⁴⁷

Imamoglu *et al.* (2009),⁴⁹ realizaron una investigación para comparar el efecto de la interacción entre diferentes medios de cultivo y dos niveles de intensidad de luz, con el propósito de mejorar la tasa de acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*. Se evaluó la combinación de cinco medios de cultivo a dos niveles de intensidad lumínica, los mejores resultados se obtuvieron a partir del medio de cultivo libre de nitrógeno con 546 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ y agua destilada con 546 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$. El estudio determinó la interacción que existe entre la intensidad de luz y la concentración de nutrientes en el medio, de acuerdo con los resultados la combinación óptima elegida fue agua destilada y una intensidad de luz de 546 $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$. en base con lo obtenido se concluye que la reduc-

ción de nitratos en el medio junto con altas intensidades de luz resultaron ser una combinación óptima. Sin embargo, el uso de agua destilada como medio, obtuvo resultados favorables en la síntesis de astaxantina. Tomando como criterio el factor económico, utilizar agua destilada en sustitución del medio de cultivo original resulta ser más barato que utilizar medio libre de nitratos. En sistemas de producción de tamaño industrial el ahorro resultaría favorable. Para la determinación de astaxantina se utilizó dimetilsulfoxido como disolvente de extracción. Se realizaron lecturas de absorbancia a 490 nm. Así también desarrollaron una curva de calibración utilizando un estándar de astaxantina pura (Acros Co.).

Wu *et al.* (2010),⁵⁰ desarrollaron un diseño factorial 3x3x3 a diferentes intensidades de radiación ultravioleta (UV-B) y varios intervalos de tiempo para evaluar el efecto en la acumulación de astaxantina en cultivos de *H. pluvialis*. De acuerdo con los resultados, la radiación UV-B tuvo un efecto negativo en la tasa de células vivas ($P<0.01$) pero no presentó efecto significativo en el incremento del peso seco celular ($P>0.05$). Sin embargo, influyó de manera positiva en la acumulación de astaxantina ($P<0.01$) obteniendo concentraciones de 3.2 mg/g con respecto a los resultados del experimento control. Las células fueron expuestas a 3 y 5 W/m² de UV-B por 60 minutos para evaluar la actividad antioxidante enzimática y los resultados demostraron que la enzima glutatión peroxidasa presentó una alta actividad en presencia de luz UV-B como factor de estrés. El estudio permitió demostrar que la radiación UV-B tiene un efecto negativo en la tasa de supervivencia de las células, sin embargo, aceleró la acumulación de astaxantina. La cuantificación de astaxantina se realizó por medio de HPLC de acuerdo al procedimiento de Boussiba *et al.* (1999).⁵¹

Choi *et al.* (2011),⁵² evaluaron el comportamiento de seis inóculos en diferentes fases de crecimiento, el propósito fue determinar la mejor fase del ciclo de vida de *H. pluvialis* para ser transferida a la segunda etapa del proceso de producción de astaxantina, se utilizaron métodos de cultivo *batch* y semicontinuos, en ambos se confirmó que el inóculo número seis el cual se encuentra en una fase de vida senescente con un tamaño celular grande, en condiciones altas de irradiación, deficiencia de nitrógeno y adición de acetato, es la mejor opción para la acumulación de astaxantina. La cuantificación de astaxantina se realizó utilizando dimetilsulfóxido y efectuando lecturas a 492 nm con un espectrofotómetro de acuerdo al método propuesto por Davis (1976).⁵³

Hong *et al.* (2012),⁵⁴ realizaron un estudio para evaluar el comportamiento de una cepa fotosensible (mutante) de *H. pluvialis* en la producción de astaxantina. Se efectuó una lesión parcial en el fotosistema II del aparato fotosintético de las células. La cepa PP-PS #160 mostró el mejor rendimiento en la producción de astaxantina. Se realizó un análisis al extracto obtenido y se determinó que la distribución del ester de astaxantina no presenta diferencias de la obtenida por cepas silvestres. Las características fotosensibles y fotoinducibles de la cepa mutante se mantuvieron inalteradas durante un año y medio. La luz requerida para producir 1 g de astaxantina se redujo 76 %, por el contrario la proliferación celular se vio reducida en la fase vegetativa. Los resultados demuestran que la cepa fotosensible aumentó el rendimiento de astaxantina en condiciones de luz moderada (70 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$). La cuantificación de astaxantina se efectuó por medio de HPLC (Shimadzu) equipado con un detector UV-visible (SPD-10A, Shimadzu).⁵⁵

Con base en la descripción de los 15 artículos podemos notar que el diseño experimental propuesto varió de estudio a estudio, así como, las condiciones de cultivo, diseño del fotobiorreactor y los factores de estrés. El rango para el volumen de trabajo fue de 50 a 2000 mL, tiempo de cultivo de 4 a 36 días, los medio de cultivo más utilizados fueron Basal Bold^{35, 38, 40, 41} y Kobayashi.^{34, 37, 39, 48} En general, se puede observar una heterogeneidad en el diseño y factores evaluados en los estudios analizados. El factor luz (intensidad y longitud de onda) fue el más estudiado, debido a que es el que causa un mayor impacto en la respuesta fisiológica de las células.⁵⁶ Un aspecto importante a destacar de esta revisión es que solo se encontró un artículo latinoamericano.³⁵ Mientras que Japón es el país con mayor número de estudios realizados, seguido de Corea del sur.

Conclusiones

A pesar del uso biotecnológico prometedor, la aplicación de microalgas a escala industrial ha sido escasa, debido a los altos

costos de producción que conlleva. Es por eso que existe la tendencia hacia disminuir los costos de operación. Con el propósito de mejorar la síntesis de astaxantina, hasta el momento se han realizado varios estudios para determinar los mejores factores de crecimiento y producción de astaxantina a partir de *H. pluvialis*. Existen muchos avances en el uso de nuevas fuentes de iluminación por ejemplo fibra óptica y LEDs a determinadas longitudes de onda. Sin embargo, las opciones disponibles hasta el momento todavía son pobres en términos de rendimiento general. En el campo de la genética, se investiga en la obtención de cepas fotosensibles, y en la reducción del tamaño de la antena molecular de la clorofila con el propósito de mejorar la eficiencia fotosintética. Sin embargo, aún hace falta realizar más investigaciones en esta área, que requerirá una mejor comprensión del efecto de los factores de crecimiento y estrés que permitan mejorar los resultados en la producción de astaxantina.

Referencias

1. Yuan J-P, Peng J, Yin K, Wang J-H. Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. *Mol Nutr Food Res*. 2011; 55(1):150-165.
2. Del Río E, Acién FG, Guerrero MG. Photoautotrophic production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis*. In: *Sustainable Biotechnology*. 2010:247-258.
3. Goswami G, Chaudhuri S, Dutta D. The present perspective of astaxanthin with reference to biosynthesis and pharmacological importance. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010; 26(11):1925-1939.
4. Ambati RR, Phang SM, Ravi S, Aswathanarayana RG. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications--a review. *Mar Drugs*. 2014; 12(1):128-152.
5. Matsushita Y. Antioxidant activity of polar carotenoids including astaxanthin-B-glucoside from marine bacterium on PC liposomes. *Fish Sci*. 2000; 66:980-985.
6. Liu X, Osawa T. Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-trans isomer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 357(1):187-193.
7. Park JS, Chyun JH, Kim YK, Line LL, Chew BP. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutr Metab (Lond)*. 2010; 7:18.
8. Nakagawa K, Kiko T, Miyazawa T, et al. Antioxidant effect of astaxanthin on phospholipid peroxidation in human erythrocytes. *Br J Nutr*. 2011; 105(11):1563-1571.
9. Akyon Y. Effect of antioxidants on the immune response of *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8(7):438-441.

10. Kim JH, Kim YS, Song GG, Park JJ, Chang HI. Protective effect of astaxanthin on naproxen-induced gastric antral ulceration in rats. *Eur J Pharmacol.* 2005; 514(1):53-59.
11. Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* 2003; 21(5):210-216.
12. Bhuvaneswari S, Anuradha CV. Astaxanthin prevents loss of insulin signaling and improves glucose metabolism in liver of insulin resistant mice. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012; 90(11):1544-1552.
13. Hix LM, Lockwood SF, Bertram JS. Bioactive carotenoids: potent antioxidants and regulators of gene expression. *Redox Rep.* 2004; 9(4):181-191.
14. Hussein G, Nakamura M, Zhao Q, et al. Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28(1):47-52.
15. Curek GD, Cort A, Yucel G, et al. Effect of astaxanthin on hepatocellular injury following ischemia/reperfusion. *Toxicology.* 2010; 267:147-153.
16. Yamashita E. Astaxanthin as a Medical Food. *Functional Foods in Health and Disease.* 2013; 3(7):254-258.
17. Lemoine Y, Schoefs B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynth Res.* 2010; 106(1-2):155-177.
18. Borowitzka M a. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *J Appl Phycol.* 2013; 25(3):743-756.
19. Solovchenko a E. Physiology and adaptive significance of secondary carotenogenesis in green microalgae. *Russ J Plant Physiol.* 2013; 60(1):1-13.
20. Li Y, Sommerfeld M, Chen F, Hu Q. Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J Appl Phycol.* 2010; 22(3):253-263.
21. Dominguez-Bocanegra A, Guerrero Legarreta I, Martinez Jeronimo F, Tomasini Campocosio A. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol.* 2004; 92(2):209-214.
22. Li Y, Sommerfeld M, Chen F, Hu Q. Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: A protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J Plant Physiol.* 2008; 165(17):1783-1797.
23. Tjahjono AE, Hayama Y, Kakizono T, Terada Y, Nishio N, Nagai S. Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnol Lett.* 1994; 16(2):133-138.
24. Wayama M, Ota S, Matsuura H, Nango N, Hirata A, Kawano S. Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS One.* 2013; 8(1):e53618.
25. Pérez-López P, González-García S, Jeffries C, et al. Life cycle assessment of the production of the red antioxidant carotenoid astaxanthin by microalgae: from lab to pilot scale. *J Clean Prod.* 2014; 64:332-344.
26. Del Campo J a, García-González M, Guerrero MG. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 74(6):1163-1174.
27. Li J, Zhu D, Niu J, Shen S, Wang G. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Adv.* 2011; 29(6):568-574.
28. Liu XJ, Wu YH, Zhao LC, Xiao SY, Zhou AM, Liu X. Determination of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* by first-order derivative spectrophotometry. *J AOAC Int.* 2011; 94:1752-1757.
29. Lababpour A, Lee C-G. Simultaneous measurement of chlorophyll and astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cells by first-order derivative ultraviolet-visible spectrophotometry. *J Biosci Bioeng.* 2006; 101(2):104-110.
30. Sultana N, Arayne MS, Nawaz M, Ali KA. Zero-crossing derivative spectrophotometry and liquid chromatographic method for the quantitative determination of clopidogrel in presence of HMG co-a reductase inhibitors. 2013; 1:1584-1589.
31. García-Malea MC, Acien FG, Del Río E, et al. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: taking the one-step system outdoors. *Biotechnol Bioeng.* 2009; 102(2):651-657.
32. Acien Fernández FG, Fernández Sevilla JM, Molina Grima E. Photobioreactors for the production of microalgae. *Rev Environ Sci Bio/Technology.* 2013; 12(2):131-151.
33. Nguyen KD. Astaxanthin : A Comparative Case of Synthetic VS Natural Production Astaxanthin : A Comparative Case of. 2013. Chemical and Biomolecular Engineering Publications and Other Works. 2013; 1(1):1-11.
34. Katsuda T, Lababpour A, Shimahara K, Katoh S. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme Microb Technol.* 2004; 35(1):81-86.
35. Dominguez-Bocanegra a. R, Legarreta IG, Jeronimo FM, Campocosio a. T. Influence of enviromental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol.* 2004; 92(2):2089-2214.
36. Yuan JP, Gong XD, Chen F. Separation and analysis of carotenoids and chlorophylls in *Haematococcus lacustris* by high-performance liquid chromatography photodiode array detection. *J Agric Food Chem.* 1997; 45(97):1952-1956.
37. Lababpour A, Hada K, Shimahara K, Katsuda T, Katoh S. Effects of nutrient supply methods and illumination with blue light emitting diodes (LEDs) on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *J Biosci Bioeng.* 2004; 98(6):452-456.

38. Orosa M, Franqueira D, Cid a, Abalde J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol*. 2005;96(3):373-378.
39. Lababpour A, Shimahara K, Hada K, Kyoui Y, Katsuda T, Katoh S. Fed-batch culture under illumination with blue light emitting diodes (LEDs) for astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *J Biosci Bioeng*. 2005; 100(3):339-342.
40. Kim Z-H, Kim S-H, Lee H-S, Lee C-G. Enhanced production of astaxanthin by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme Microb Technol*. 2006; 39(3):414-419. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.11.041.
41. Suh IS, Joo H-N, Lee C-G. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. *J Biotechnol*. 2006; 125(4):540-546.
42. He P, Duncan J, Barber J. Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*: Effects of Cultivation Parameters. 2007; 49(4):447-452.
43. Boussiba S, Vonshak A. Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol*. 1991; 32(7):1077-1082.
44. Steinbrenner J, Linden H. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiol*. 2001; 125(February):810-817.
45. Ranjbar R, Inoue R, Shiraishi H, Katsuda T, Katoh S. High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in a bubble column photobioreactor. *Biochem Eng J*. 2008; 39(3):575-580.
46. Ranjbar R, Inoue R, Katsuda T, Yamaji H, Katoh S. High efficiency production of astaxanthin in an airlift photobioreactor. *J Biosci Bioeng*. 2008; 106(2):204-207.
47. Yuan J-P, Chen F. Chromatographic Separation and Purification of trans-Astaxanthin from the Extracts of *Haematococcus pluvialis*. *J Agric Food Chem*. 1998; 46(8):3371-3375.
48. Katsuda T, Shiraishi H, Ishizu N, Ranjbar R, Katoh S. Effect of light intensity and frequency of flashing light from blue light emitting diodes on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *J Biosci Bioeng*. 2008; 105(3):216-220.
49. Imamoglu E, Dalay MC, Sukan FV. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *N Biotechnol*. 2009; 26(3-4):199-204.
50. Wu Z, Chen G, Chong S, Mak N-K, Chen F, Jiang Y. Ultraviolet-B radiation improves astaxanthin accumulation in green microalga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Lett*. 2010; 32(12):1911-1914.
51. Boussiba S, Bing W, Yuan JP, Zarka A, Chen F. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnol Lett*. 1999; 21(7):601-604.
52. Choi Y-E, Yun Y-S, Park JM, Yang J-W. Determination of the time transferring cells for astaxanthin production considering two-stage process of *Haematococcus pluvialis* cultivation. *Bioresour Technol*. 2011; 102(24):11249-11253.
53. Davies BH. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. In: London: Academic Press. 1976:38-155.
54. Hong M-E, Choi SP, Park Y-I, et al. Astaxanthin production by a highly photosensitive *Haematococcus mutant*. *Process Biochem*. 2012; 47(12):1972-1979.
55. Kang CD, Lee JS, Park TH, Sim SJ. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005; 68:237-241.
56. Carvalho AP, Silva SO, Baptista JM, Malcata FX. Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011; 89(5):1275-1288.