

## **CONDICIONES DE CULTIVO ESTÁNDAR RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS**

### **STANDARD CULTURE CONDITIONS RELATED TO THE PRODUCTION OF ASTAXANTHIN IN HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS**

**\*Camacho K. Judith E., Lancheros D. Ana G., Huerfano T. Myriam. J.**

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, *Facultad Ciencias de la salud Calle 28 No 6 – 02 Bogotá*  
-Colombia

Recibido 21 de Octubre 2015; aceptado 30 de Marzo de 2016

#### **RESUMEN**

---

*La astaxantina es un pigmento natural ampliamente distribuido en la naturaleza y de gran interés comercial como colorante y por sus diversas propiedades como pigmento y bioactivas. El Haematococcus pluvialis es un alga verde que acumula carotenoides, principalmente astaxantina cuando es expuesto a condiciones de estrés. Sin embargo, en la literatura no se encuentran estudios sistemáticos que permitan determinar las condiciones de estrés que mejor favorezcan la acumulación de astaxantina para una producción industrial más rentable. Para tal fin se debe establecer inicialmente la línea base de comportamiento de H. pluviales a condiciones de cultivo estándar, propósito del presente trabajo mediante la revisión teórica de las diferentes condiciones de crecimiento de H. pluviales en los medios de*

*cultivo reportados relacionados con la mayor producción de astaxantina, para lo cual se tienen en cuenta valores de pH, temperatura, CO<sub>2</sub>, aireación, luz, ciclos luz/oscuridad, agitación, deficiencia de nitrógeno y fósforo.*

Autor a quien dirigirse la correspondencia. \*Camacho Kurmen Judith Elena. Correo electrónico: [jelenacamacho@hotmail.com](mailto:jelenacamacho@hotmail.com).

**Palabras claves:** *Pigmento, microalga, carotenoides, condiciones del cultivo, medio de cultivo*

## ABSTRACT

---

*Astaxanthin is a natural pigment widely distributed in nature and of great commercial interest as a colorant and its various properties as a pigment and bioactive. Haematococcus pluvialis is a green alga which accumulates carotenoids, particularly astaxanthin when exposed to stress conditions. However, in the literature there are systematic studies to determine the stress conditions that best the accumulation of astaxanthin for more profitable industrial production. To that end should initially set the base line behaviour of H. pluvialis in standard culture conditions, purpose of this work was the reviewing of the different growth conditions of H. pluvialis in the culture media reported related with more production of astaxanthin, for which takes into account pH, temperature, CO<sub>2</sub>, aeration, light, light / dark cycles, agitation, nitrogen and phosphorus deficiency.*

**Keywords:** *carotenoids, microalgae, culture conditions, the culture medium, pigment.*

## INTRODUCCIÓN

---

Las microalgas son fuente de un gran número de compuestos bioactivos de interés

industrial, como los carotenoides que se utilizan como colorantes naturales en alimentación animal y humana, así como en

la industria farmacéutica, cosmética y en la acuicultura. Además se han propuesto como agentes efectivos en la prevención de una variedad de enfermedades, debido a su capacidad antioxidante, inmunoreguladora, anti-inflamatoria y anti-cancerígena.

El ketocarotenoide astaxantina es el más importante desde el punto de vista biotecnológico. Hoy la mayor cantidad de astaxantina es producida por síntesis química y es vendida a un precio de US \$2500/kg. El alto precio y el incremento en la demanda para este compuesto, especialmente de origen natural, en las diferentes industrias, hace que sea de interés la producción astaxantina a partir de microalgas como la *H. pluvialis*, que acumula cantidades importantes (más del 4%/g de peso seco) y de mejor calidad que las obtenidas por otras fuentes como levaduras y plantas. La acumulación del

pigmento en *H. pluvialis* ocurre durante la transformación de la microalga desde el estado vegetativo (fase verde) a aplanospora (fase roja) cuando cesa su crecimiento en la fase estacionaria. Otros tipos de estrés inducen la acumulación de astaxantina como son temperatura, intensidad lumínica, ciclos de luz/oscuridad, concentración de nutrientes, pH, especies reactivas de oxígeno, sales y presencia de inhibidores de procesos metabólicos a diferente nivel. Sin embargo, esta microalga tiene sus dificultades en el momento de cultivo y de obtener el pigmento en cantidades de interés debido a su ciclo celular complejo. Es por lo tanto necesario establecer las condiciones de crecimiento adecuadas que lleven a una buena producción de biomasa y posteriormente de astaxantina para poder considerar a *H. pluvialis* como fuente natural de este.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

**Condiciones de cultivo.** Microorganismo estudiado: *Haematococcus pluvialis*.

**Establecimiento de crecimiento a condiciones estándar reportadas para establecer una plataforma de trabajo y línea base de crecimiento.**

Revisión de artículos relacionados con el cultivo de *H. pluvialis* bajo condiciones estándar y controladas, reportadas. Los parámetros elegidos para seleccionar los medios de cultivos y condiciones relacionadas fueron la biomasa por peso seco y la concentración de astaxantina.

## Determinación de la producción de astaxantina.

Se determinó la producción de la concentración de astaxantina y unidades de medición.

## Diseño experimental y análisis de datos

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fisiológicamente la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis* ocurre en respuesta a varias condiciones de estrés ambiental como alta intensidad de luz, limitaciones de nitrógeno, fósforo y estrés por sal. (Steinbremer J. y Linden H, 2001) (Wang *et al.*, 2013).

El cambio morfológico en *H. pluvialis* de células vegetativas verdes, para incrementar el número de células, a células con quistes rojos que acumulan astaxantina, es inducido por algunos factores, tales como: temperatura alta, deficiencia de nutrientes (nitrato, magnesio, sulfato y fosfato), alta intensidad de luz, alta salinidad y estrés oxidativo. (Yoshimura *et al.*, 2006) (Ranbjar *et al.*, 2008) (Hana *et al.* 2013).

Otras de las condiciones de estrés ensayadas son: estrés de nutrientes, alta intensidad de luz, alta salinidad (Lababpour

Se realizó un análisis multicriterio de los medios reportados en la literatura y de condiciones fotoautotróficas: pH, temperatura, CO<sub>2</sub>, aireación, luz, ciclos luz/oscuridad, agitación, deficiencia de nitrógeno.

A y Gyun Lee, 2006), pH y nutrientes orgánicos como acetato (Eonseon *et al.*,

2006) ó combinación cloruro de sodio/acetato de sodio, aumentando el contenido total de carotenoides y contenido total de astaxantina. (Vidhyavathi *et al.*, 2008).

En la tabla 1 se pueden observar en forma general las diferentes condiciones de cultivo ensayadas en los estudios revisados, incluyendo el uso de fotobioreactores, mezclándolo con irregulares ciclos de luz/oscuridad. (Ranbjar *et al.*, 2008).

Tabla 1. Condiciones de cultivos de *haematococcus pluvialis* relacionados con concentración de astaxantina.

CONDICIONES DE CULTIVO AUTOR	CONCENTRACIÓN DE ASTAXANTINA
Se usó disminución de nitrato (5% del medio), alta intensidad de luz blanca (150 umol/m <sup>2</sup> s) Grünewald <i>et al.</i> ,2000	Acumulación

Presencia de acetato de sodio (45 mM), Fe(II) (450 uM), alta intensidad de luz (125 umol/m <sup>2</sup> s). Steinbremer J y Linden H 2001	13,5 mg/g peso seco
Medio bristol, temperatura 25°C, fotoperiodo 12/12/1.25 g/l de NaNO <sub>3</sub> es la concentración adecuada para un mayor rendimiento e biomasa; 2003.	Acumulación
Medio OHM, temperatura 25 °C, pH 7.2 - 7.8, fotoperiodo 12:12, Aireación con CO <sub>2</sub> intermitente por 10 seg durante 10 min, intensidad lumínica 40 μmol fotón/m <sup>2</sup> /s (Lámparas fluorescentes blancas) 240 μmol fotón/m <sup>2</sup> /s (Recomiendan una intensidad mayor para la formación del pigmento); 2003	9,6 mg l-1 día
Se usó alta intensidad de luz (350 umol/m <sup>2</sup> s) Wang B. y Zarca A ,2003	43 mg/ml
Medio bristol, Temperatura 23 +/- 2 durante 14d, pH 6.0, fotoperiodo 12/12, PFD 35 Y 85 mol m-2 s-, NH <sub>4</sub> Cl como fuente de nitrógeno que obtuvo la mayor concentración de biomasa; Cifuentes <i>et al.</i> 2003	10,3 mg/g
Se usa estrés oxidativo: acetato de sodio, Fe(II), alta intensidad de luz Wang et al., 2004.	Acumulación de astaxantina
Medio Basal Bold, Temperatura 28 °C, Iluminación continua, 1.5 % CO <sub>2</sub> , BAR para mayor producción de astaxantina; Domínguez <i>et al.</i> , 2004.	98 mg/g
Se usó luz blanca LEDS (600 umol/m <sup>2</sup> s) Torzillo <i>et al.</i> , 2005.	23,7 % del total de carotenoides
Se usó alta intensidad de luz (80 umol/m <sup>2</sup> s), 5% CO <sub>2</sub> , limitación nitrógeno y fósforo; Kang <i>et al.</i> , 2006.	77 mg/g

Se usó Iluminación con LEDS azul (8-12 umol/m <sup>2</sup> s), ajuste de pH menor a 9,5; Labapour <i>et al.</i> , 2005.	50 – 70 ug/ml
Alta intensidad de luz, pH 6.3 +/- 0.5, CO <sub>2</sub> , agitación; Lababpour A. y Gyun Lee, 2006	12 mg/ml
Luz azul LEDS (12 umol/m <sup>2</sup> s); Yoshimura <i>et al.</i> , 2006	0,13 – 0,16 ug/ml/h
Se usó alta intensidad de luz (430 umol/m <sup>2</sup> s), alta concentración de cloruro de sodio (más de 0,8%), estrés de nitrógeno y fósforo, presencia de nitrato de calcio, acetato de sodio (45 mM), sulfato de hierro (450 uM) y malonato; Eonseon <i>et al.</i> , 2006	Alta producción de astaxantina
Se usó temperatura (25°C), aireación de CO <sub>2</sub> (1,5%v/v), alta intensidad de luz blanca (75 umol/m <sup>2</sup> s), pH menor de 8.0, fertilizantes (urea + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> +KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ó N-P-K); Meltem <i>et al.</i> , 2007	Biomasa 0,90 g/L
Se uso alta intensidad de luz (700 umol/m <sup>2</sup> s), 2,42 g/L de trisacetato; Steinbrenner J. y Sandmann G., 2006.	11,4 mg/g +/- 0,9 peso seco
Medio OHM, pH7.0, temperatura 25 ± 0,5 °C, lámparas fluorescentes marca Sylvania Daylight F48T12/D de 39W con una intensidad lumínica de 5000 ± 50 lux, 0.51 % CO <sub>2</sub> , concentración nitrógeno 4 mM; Domínguez <i>et al.</i> , 2007.	Acumulación
Ciclo luz/oscuridad, temperatura (20°C), pH cercano a 8.0, aireación de CO <sub>2</sub> , fotobioreactor, ciclos luz : oscuridad; Ranbjar <i>et al.</i> , 2008	460 – 600 mg/ml
Presencia de alta intensidad de luz (60 umol/m <sup>2</sup> s), estrés de nutrientes, cloruro de sodio(17,1 mM)/acetato de sodio (4,4 mM) Vidhyavathi <i>et al.</i> , 2008.	24.5 - 32 mg/g peso seco

Medio Bold Basal, temperatura 25 °C, fotoperiodo 16:8, intensidad luminica60 μmol fotón/m2/s; 2008	24.5 mg/ g de peso seco	
Estrés oxidativo por ortovanadato de sodio (menos de 5mM), temperatura 24 °C, iluminación continua con luz fluorescente blanca (40 umol/m²s), aireación de CO2 (0,2 vvm) Tran <i>et. al.</i> , 2009.	10,7 mg/g biomasa	
Bristol selectivo Con agitación controlada de 25°Cun fotoperiodo de 12 h. luz-12 h. oscuridad 0.25, 0.50, 0.75 ,1.0, 1.25 y 1.5 g/L; Sosa, 2009; Ramírez, 2013.	Acumulación	
F/2 Sin Nitrógeno, pH, 8,3714 -15 °C, Luz solar, luz UV-vis, oscuridad; Sosa, 2009	Acumulación	
F/2 ,pH7-8,2, Temperatura 14 -15 °C, luz solar, luz UV-vis, oscuridad; Sosa, 2009	Acumulación	
F/2, pH 7,7-8,2, temperatura 14 -15 °C, luz solar, luz UV-vis, oscuridad, Sosa, 2009.	Acumulación	
Fertilizante folicular (QF), pH 7,7-8,2, temperatura 14 -15 °C, Luz solar, luz UV-vis, oscuridad; Sosa, 2009.	Acumulación	
Temperatura 25 °C, pH 8.0, Iluminación continua No se dan concentraciones pero si se usa Medio BG11 y RM Variaron condiciones autótrofas, heterotróficas y mixotróficas. 75 mol fotones; Imamoglu <i>et al.</i> 2009.	Acumulación	
Medio bristol, temperatura 20°± 2 °C, pH 6, Iluminación continua; Gómez <i>et. al.</i> , 2009.	58.42±4.0 pg cel	
Medio M1, pH 7.0, temperatura 25 ± 0,5 °C, lámparas fluorescentes marca Sylvania Daylight F48T12/D de 39W con una	Acumulación	
intensidad lumínica de 5000 ± 50 lux0.51% CO <sub>2</sub> , ausencia de nitrógeno; Ramírez, 2013.		Acumulación
Medio BBM, pH 7.0, 25 ± 0,5 °C lámparas fluorescentes marca Sylvania Daylight F48T12/D de 39W con una intensidad lumínica de 5000 ± 50 lux0.5%CO <sub>2</sub> , Nitrógeno en concentración 3,28x10-3 M, Ramírez, 2013.		Acumulación
Medio F1, pH 7.0, Temperatura 25 ± 0,5 °C, lámparas fluorescentes marca Sylvania Daylight F48T12/D de 39W con una intensidad lumínica de 5000 ± 50 lux, 0.51% CO <sub>2</sub> , Concentración de nitrógeno 3,28x10-3 M; Ramírez, 2013.		Acumulación
Medio BG-11, pH7.0, temperatura 25 ± 0,5 °C, lámparas fluorescentes marca Sylvania Daylight F48T12/D de 39W con una intensidad lumínica de 5000 ± 50 lux, 0.51% CO <sub>2</sub> Concentración de nitrógeno 3,28x10-3 M; Ramírez, 2013.		Acumulación
Medio HONG-KONG, pH7.0, temperatura 25 ± 0,5°C, lámparas fluorescentes marca Sylvania Daylight F48T12/D de 39W con una intensidad lumínica de 5000 ± 50 lux, 0.51 % CO <sub>2</sub> , ausencia de nitrógeno; Ramírez, 2013.		Acumulación
Medio M6, pH 7.0, temperatura 25 ± 0,5 °C lámparas fluorescentes marca Sylvania Daylight F48T12/D de 39W con una intensidad lumínica de 5000 ± 50 lux,0.51 % CO <sub>2</sub> ; Ramírez, 2013.		Acumulación
Medio OHM, pH 7.0, temperatura 25 ± 0,5 °C, lámparas fluorescentes marca Sylvania Daylight		Acumulación

F48T12/D de 39W con una intensidad lumínica de 5000 ± 50 lux, 0.51%CO <sub>2</sub> , concentración nitrógeno 3,28x10 <sup>-3</sup> M; Ramírez, 2013.	
Medio Z8, pH 7,0 25 ± 0,5 °C, lámparas fluorescentes marca Sylvania Daylight F48T12/D de 39W con una intensidad lumínica de 5000 ± 50 lux 0.51% CO <sub>2</sub> , Ausencia de nitrógeno; Ramírez, 2013.	Acumulación
Medio BBM, Temperatura 30°C, pH 5, Iluminación continua /acetato de sodio 0,25%; Hanan <i>et al.</i> , 2013	Acumulación
Medio WC, temperatura 23°C, pH7, fotoperiodo 12/12 4 % de CO <sub>2</sub> / 350 micromoles de fotones; Nunes <i>et al.</i> 2013.	17,66±1,22 mg/g
Medio BBM, temperatura 24°C/fotoperiodo12/12/Adición de 6 concentraciones distintas de vit B12, intensidad lumínica 60 mmol / m <sup>2</sup> / s; Li <i>et al.</i> , 2013.	28,35 mg / l
Medio BG11, temperatura 20 °C, pH 7 - 8, iluminación continua, 1.5 % de CO <sub>2</sub> , bajas concentraciones de nitrógeno biomasa, intensidad lumínica 30 μmol m <sup>-2</sup> s; Wang <i>et al.</i> , 2013.	16.0 mg L <sup>-1</sup> d-

La acumulación del pigmento en *H. pluvialis* ocurre durante la transformación de la microalga desde el estado vegetativo (fase verde) a aplanospora (fase roja) cuando cesa su crecimiento en la fase estacionaria.

De acuerdo a la revisión realizada los factores que inducen la acumulación de astaxantina pueden ser temperatura, intensidad lumínica, ciclos de luz/oscuridad, concentración de nutrientes, pH, especies reactivas de oxígeno, sales y presencia de inhibidores de procesos metabólicos a diferente nivel, ya que esta microalga tiene sus dificultades en el momento de cultivo y de obtener el pigmento en cantidades de interés debido a su ciclo celular complejo.

## CONCLUSIÓN

Se logró establecer que las condiciones de crecimiento adecuadas para la microalga *H. pluvialis* que llevan a una buena producción de astaxantina son: utilizar medios de cultivo como el BBM, OHM y BG11 bajo condiciones de pH 7, fotoperiodo 20/4, temperatura 25 °C, agitación continua, CO<sub>2</sub> 5 % e iluminación

con lámparas fluorescentes blancas 40 umol/m<sup>2</sup>s.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Ambati R, Phang S, Ravi S and Aswathanarayana R. (2014). Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *Mar. Drugs*. 2009,12: 128-152p.
- Bosung Ku, Jeong J.C., Mijts B.N., Schmidt-Dannert C., and Dordick J.S..Preparation, Characterization, and Optimization of an In Vitro C30 Carotenoid Pathway. *Applied and environmental microbiology*, 2005. Vol. 71 No 11. 6578–6583p.
- Cifuentes Ana, González Mariela, Vargas Silvia, Hoeneisen Maritza y González Nelsón. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biol Res* 36, 2003. 343-357p.
- Domínguez-Bocanegra A. R., Guerrero Legarreta I, Martinez Jeronimo F, Tomasini Campocosio A. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresources Technolofy*, 2004 Apr; 92 (2) : 209-14p.
- Domínguez-Bocanegra R, Ponce-Noyola T, Torres-Muñoz J. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007; 75: 783-791.
- Eonseon J., Gyun lee Ch., and Polle J.. Secondary Carotenoid Accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): Biosynthesis, Regulation, and Biotechnology. *Journal of of Microbiology and Biotechnology*. 2006. 16: 821–83p.
- Gómez L. Liliana, Menéndez Joaquin, Álvarez inaudis, Flores Ignacio. Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03T) sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de *Haematococcus pluvialis* Flotow en suficiencia y ausencia de nitrógeno. (2009). *Bioteconología Vegetal*, Vol. 9, No. 2: 105 – 117p.
- Grünewald K.; Manfred E.;Hirschberg J Hage. C. Phytoene desaturase is localized exclusively in the Chloroplast and up-regulated and the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales,Chlorophyciae). *Plant Physiology*.2000.Vol. 122.
- Hanan N, Al-Shorgani N, Shukor H, Rahman N, KalilM. Pre-Optimization Conditions for *Haematococcus pluvialis* Growth. *International Journal on advanced*



*sciences, engineering and information technology. 2013. 2: 70- 73p*

Imamoğlu, Esra, Dalay Meltem Conk, Sukan Fazilet Vardar. Effect of different cultivation models on growth of *Haematococcus pluvialis* floto, 2009, International journal of natural & engineering sciences, vol. 3 issue 2,10p.

Kang C, Lee J, Park T., Sim S. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 74: 987-994.

Katsuda T.,Shimahara K.,Shiraishi H.,Yamagami K.,Ranbjar R.,Kato S. Effect of flashing light from blue light emitting diodes on cell growth and Astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2006.Vol 102 No5.442-446p.

Lababpour A. Gyun Lee C. Simultaneous Measurements of Chlorophyll and Astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cells by first order derivative ultraviolet-visible Spectrophotometry. *Journal of Bioscience and Bioengineering.*2013. 101:104-110p.

Labapour A. Shimahara K. Hada K. Kioui Y.Katsuda T.Kato S. Fed-batch culture under illumination with blue light emitting diodes (LEDS) for Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*.*Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2005. Vol 100 No3. 339-342p.

Li Li Xin, Song Zhi-wei, Zhan You, Duan Shun-shan Zhao Qian-shen y Liu Yan. Effect of Vitamin-B12 and Vitamin-H on the Growth and Astaxanthin Content of *Haematococcus pluvialis* CH-1 1. *Advance Journal of Food Science and Technology,* 2013.5(9): 1139-1142.

Meltem conk D., Imamoglu E., and Demirel Z. Agricultural fertilizers as economical alternative for cultivation of *Haematococcus pluvialis*.. *J Microbiol. Biotechnol.* 2007. Vol. 17(3). 393–397p.

Nunes, Moira, Vieira, Armando Augusto Henriques, Pinto, Ernani, Carneiro, Ronaldo Leal, & Monteiro, Antonio Carlos. Carotenogênese em células de *Haematococcus pluvialis* induzidas pelos estresses luminoso e nutricional. *Pesquisa Agropecuária Brasileira,* 2013. 48(8), 825-832p.

Ramírez L. Daniel M. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. Tesis de investigación. Universidad Nacional. 2013. 1-123p.

- Ranjbar R., Inoue R., Katsuda T., Yamaji H., Katoh S. High efficiency production of Astaxanthin in an airlift photobioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008. 2008.106: 204-207p
- Rao R., Sarada A.R., Baskaran V., and Ravishankar G.A.. Identification of Carotenoids from Green Alga *Haematococcus pluvialis* by HPLC and LC-MS (APCI) and Their Antioxidant Properties. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009. Vol. 19(11). 1333–1341p.
- Sosa L. Antonieta E. Cultivo de la microalga *Haematococcus pluvialis*, en lote y fotobiorreactor para la producción de carotenoides. Tesis. Universidad Autónoma Metropolitana, 2009. 1-40p.
- Steinbremer 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 Physiology*, 2001.125, 810 – 817p.
- Steinbremer J. and Sandmann G.. Transformation of the Green Alga *Haematococcus pluvialis* with a Phytoene Desaturase for Accelerated Astaxanthin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006. Vol. 72 No. 12. 7477–7484p.
- Torzillo G., Tolga Göksan, Oya Isik and Gökpinar T.. Photon irradiance required to support optimal growth and interrelations between irradiance and pigment composition in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Eur. J. Phycol.* 2005. Vol. 40(2). 233–240p.
- Tran N.P., Park J.K., Kim Z.H., and Gyun Lee Ch.. Influence of Sodium Orthovanadate on the Production of Astaxanthin from Green Algae *Haematococcus lacustris* *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2009. Vol. 14. 322-329p.
- Vidhyavathi Raman, Venkatachalam L., et al. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental Botany* 59, 2008.1409-1418p.
- Wang B.; Zarca A. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyciae) as an active photoprotective process under high irradiance. *Journal of Physiology*. 2003. Vol.39.1116-1124p.
- Wang J, Sommerfeld M, Lu C and Hu Q. Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and

astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation *Algae* 28, 2013. 193-202p.

Wang S.B. Milton M., Qiang Hu S. Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Planta*. 2004. Vol. 220. 17–29p.

Yoshimura S. Ranbjar R. Inoue R., Katsuda T., Katoh S. Effective utilization of transmitted light for Astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006. Vol 102 No2. 97-101p.