

Pigmentos en microalgas: funciones, aplicaciones y técnicas de sobreproducción

Francisco Vera-López Portillo*, Alfredo Martínez Jiménez

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, México.

francisco.vera@ibt.unam.mx

Resumen

Los carotenoides, ficobiliproteínas y clorofila se utilizan como pigmentos “naturales”, además, debido a sus propiedades antioxidantes, son considerados agentes nutraceuticos. La utilización de microalgas para la obtención de pigmentos ha generado amplio interés debido a que existe un gran número de microalgas, entre ellas despliegan diversidad metabólica y pueden crecer en diferentes condiciones ambientales. Además, en comparación con plantas superiores, presentan velocidades de crecimiento y contenido de pigmentos altos. No obstante, las concentraciones obtenidas en su mayoría son menores del 5% (p/p) en peso seco de microalgas, lo cual hace que su producción sea económicamente poco factible en comparación con los colorantes sintéticos. En esta revisión se examinan las funciones que juegan estos pigmentos en la captación de luz y en su capacidad fotoprotectora en las microalgas; se describen los procesos de biosíntesis de estos pigmentos y se revisan investigaciones realizadas para incrementar la concentración de pigmentos evaluando parámetros de cultivo, tales como: intensidad de luz, longitud de onda, estrés oxidativo, y composición del medio de cultivo, entre otros. Con base en estos puntos, se evalúan las limitaciones y estrategias para mejorar la producción de los pigmentos en cultivos heterotróficos y autotróficos.

Palabras clave: Arrecifes, Carotenoides, ficobiliproteínas, microalgas.

Abstract

Carotenoids, phycobiliproteins, and chlorophyll are used as natural pigments, in addition, due to their antioxidant properties, they are considered nutraceutical agents. Because the metabolic diversity, the use of microalgae to obtain pigments has generated wide interest. In addition, compared to higher plants, many microalgae have high specific growth rates and a high specific pigment content. However, the pigment concentrations range, from 0.5 to 5 % (w/w) dry weight, restricts the economic feasibility to produce them at commercial scale. In this review, the functions that these pigments have in the process of capturing light and their role in their photoprotective capacity in microalgae, are examined. The biosynthetic process that generates these pigments are discussed. Also, the studies carried out to increase the concentration of pigments by modifying the cultivation parameters, such as wavelength, light intensity, oxidative stress, and the composition of the culture medium, among others, are reviewed. On the basis of this review, the limitations and strategies to improve the overproduction of pigments, in heterotrophic and autotrophic cultures, is evaluated.

Key words: Carotenoids, phycobiliproteins, microalgae.

Introducción

Actualmente la producción de pigmentos naturales ha cobrado un gran interés en diferentes industrias como la textil, cosmética, farmacéutica y alimentaria, entre otras. Esto debido a que se ha asociado el uso de colorantes artificiales en alimentos con enfermedades, tales como el trastorno de déficit de atención e hiperactividad (Mulders et al., 2014). Así mismo, se ha demostrado que algunos colorantes naturales, entre ellos los carotenoides y las ficobiliproteínas, presentan efectos preventivos para algunas enfermedades como: diabetes, obesidad y enfermedades cardiovasculares (De Mejia et al., 2020).

Los pigmentos naturales se extraen generalmente de insectos, frutas, verduras, semillas, raíces y microorganismos, estos colorantes son denominados "biocolorantes" debido a su origen biológico (De Carvalho et al., 2014; Tuli et al., 2015). Algunos ejemplos de biocolorantes extraídos de plantas y microorganismos se presentan en la tabla 1.

Debido a su uso seguro en alimentos y prevención de problemas de salud, aunado a su naturaleza ecológica, el uso de estos pigmentos ha tomado una gran importancia en la actualidad. Sin embargo, con el fin de obtener biocolorantes con precios competitivos, en comparación con los pigmentos obtenidos de recursos fósiles, se

Tabla 1. Pigmentos obtenidos de organismos.

Origen	Pigmento	Color
Plantas		
Aceite de palma	Mezcla de carotenoides	Amarillo a anaranjado
Achiote	Bixina	Anaranjado
Ají	Capsantina	Rojo-anaranjado
Betabel	Betanina	Rosa-rojo
Caléndula	Luteína	Amarillo dorado
Col morada	Antocianina	Rojo-purpura
Cúrcuma	Cucumina	Amarillo brillante
Ortiga	Clorofila	Verde olivo
Pasto	Clorofila	Verde olivo
Tomate	licopenos	Rojo
Microorganismos		
<i>Flavobacterium</i> spp. (bacteria)	Zeaxantina	Amarillo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (bacteria)	Ficocianina	Azul
<i>Serratia marcescens</i> (bacteria)	Prodigiosina	Rojo
<i>Staphylococcus aureus</i> (bacteria)	Zeaxantina	Amarillo
<i>Monascus purpureus</i> (levadura)	Monascorubramina	Amarillo-rojo
<i>Phaffia rhodozyma</i> (levadura)	Astaxantina	Rojo
Blakesela trispora (hongo)	Licopenos	Rojo
<i>Arthrospira platensis</i> (cianobacteria)	Ficocianina	Azul
<i>Dunaliella salina</i> (microalga)	β -caroteno	amarillo
<i>Galdieria sulphuraria</i> (microalga)	Ficocianina	Azul
<i>Haematococcus pluvialis</i> (microalga)	Astaxantina	Rojo
<i>Rhodomonas</i> sp (microalgas)	Clorofila	Verde olivo
<i>Scenedesmus</i> sp (microoaga)	Luteína	Amarillo dorado

Artículos

requiere mejorar las técnicas de producción de estos colorantes. El proceso de producción puede dividirse en: cultivo y cosecha de los organismos y en la recuperación de producción de estos colorantes. El proceso de producción puede dividirse en: cultivo y cosecha de los organismos y en la recuperación comparación con los pigmentos obtenidos de recursos fósiles, se requiere mejorar las técnicas de producción de estos colorantes. El proceso de producción puede dividirse en: cultivo y cosecha de los organismos y en la recuperación y purificación de los pigmentos. Para mejorar los procesos previamente mencionados es necesario conocer el proceso de biosíntesis y de degradación de estos pigmentos en los organismos que los producen, con el fin de regular su metabolismo y así poder obtener mejores rendimientos. Una vez lograda una alta productividad de los pigmentos es deseable conocer sus propiedades fisicoquímicas para garantizar procesos de extracción y purificación eficientes y de bajo costo.

Dentro de los microorganismos que producen pigmentos se encuentran las cianobacterias y las microalgas. Los cuales presentan una gran variedad de colorantes. La

principal función de los pigmentos en estos microorganismos es la absorción de energía a diferentes longitudes de onda presentes en el espectro de luz visible (figura 1). Los principales pigmentos fotosintéticos encontrados en estos microorganismos son: la clorofila, las ficobiliproteínas y los carotenos (figura 2). Cada uno de estos presenta un rango de absorción específico, siendo diferente inclusive entre pigmentos del mismo grupo (tabla 2).

El uso de microalgas para la producción de pigmentos presenta como principales ventajas: (1) amplia gama de pigmentos, (2) rápido crecimiento en comparación con plantas superiores, (3) las concentraciones de pigmentos pueden ser superiores a los encontrados en plantas superiores y, (4) facilidad de cultivos (Mulders et al., 2014).

El objetivo de este trabajo es identificar las oportunidades y restricciones en la producción de pigmentos con microalgas: conociendo la estructura y propiedades de los colorantes, las rutas de biosíntesis de estos, identificar las funciones secundarias dentro de las microalgas, y detallar las estrategias de producción de estos biocolorantes.

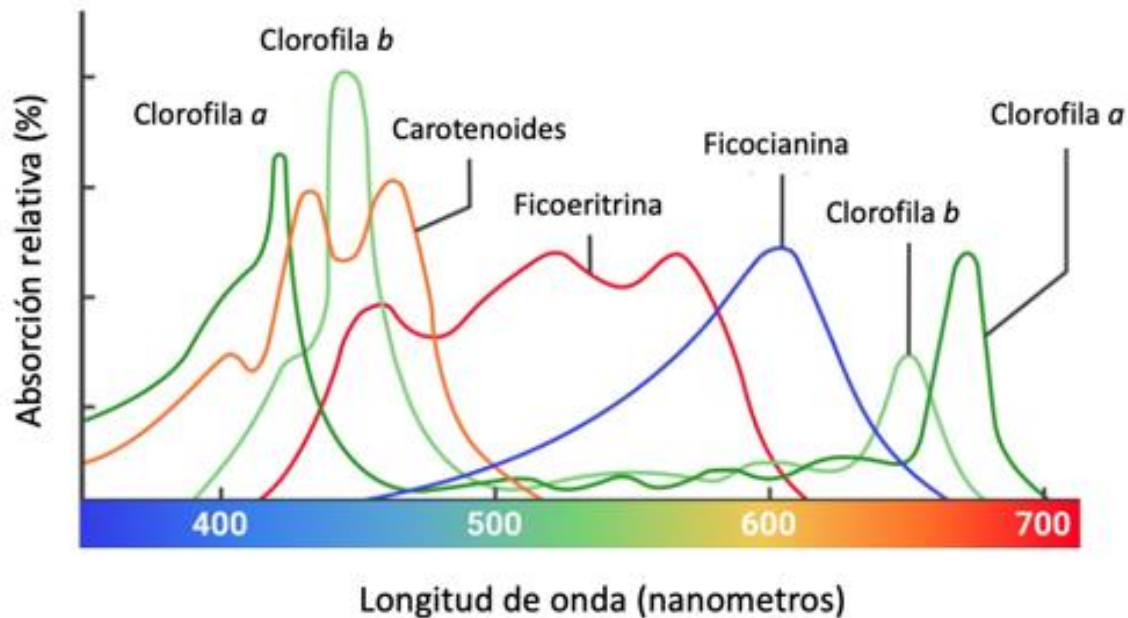


Figura 1. Espectro de absorción de los pigmentos fotosintéticos.

Modificado de <https://www.circuitbread.com/ee-faq/how-are-leds-used-for-growing-plants> (agosto 2021)



Figura 2. Principales colorantes obtenidos de las microalgas. Figura de autoría propia.

<http://www.natureontheshelf.com> (junio 2021 - Clorofila)

<http://www.plantbased-powder.com> (junio 2021 - Beta-caroteno)

Tabla 2. Principales pigmentos encontrados en microalgas.

Pigmento	Compuesto	Absorción (λ_{max})	Color
Ficobiliproteínas	Aloficocianina B	671 nm	
	Aloficocianina A	650 nm	
	Ficocianina	620 nm	
	Ficoeritrina	500 - 580 nm	
	Ficoeritrocianina	568 nm	
Clorofila	Clorofila a	663 nm	
	Clorofila b	652 nm	
Carotenoides	B caroteno	455 nm	
	Fucoxantina	490 nm	
	Luteína	445 nm	
	Astaxantina	482 nm	

Estructura de los pigmentos

Clorofila

Existen dos tipos principales de clorofila, clorofila *a* y *b*, siendo la clorofila *b* la más estable. Además, debido a reacciones de la clorofila *a*, derivadas de la influencia del pH, oxígeno e intensidad luminosa, entre otros, se generaron productos de degradación (Halim et al., 2010).

La clorofila está conformada por dos estructuras químicas: un anillo tetra pirrol y una cadena fitol (alcohol diterpénico) (figura 3A). La molécula central del anillo tetra pirrol es un ion magnesio (Mg^{2+}), el cual se

encuentra rodeado de 4 átomos de nitrógeno contenidos en una estructura denominada anillo porfirínico. Este anillo se encuentra unido a una cadena larga hidrogenada, conocida como cadena fitol. La diferencia entre los sustituyentes, tanto del anillo porfirínico como de la cola fitol, son las que dan lugar a los diferentes tipos de clorofila. Estas diferencias provocan que cada clorofila tenga una absorbancia máxima característica. La clorofila *b* presenta una absorbancia máxima en el rango de 660 a 665 nm (pigmento verde-azul) mientras que la clorofila *a* presenta una absorbancia máxima de 642 a 652 nm (pigmento verde-amarillo) (Halim et al., 2010; Mass et al., 2011).

Carotenoides

Los carotenoides comprenden más de 700 pigmentos liposolubles que presentan absorbancia en el rango de 400 a 550 nm lo que les confiere coloraciones de rojo, naranja y amarillo brillante. La mayoría de los carotenoides son hidrocarburos que contienen 40 átomos de carbono y dos anillos terminales. Los carotenoides tienen como unidad a los isoprenos y en su mayoría son tetraterpenoides (C₄₀ ó 8 unidades de isoprenoides), estos se encuentran en una molécula lineal y simétrica. El sistema de dobles enlaces conjugados les confiere una alta reactividad química, por lo cual se pueden isomerizar y oxidar fácilmente (Mezzomo & Ferreira, 2016). Su estructura básica se puede modificarse mediante hidrogenación, deshidrogenación, ciclación y oxidación.

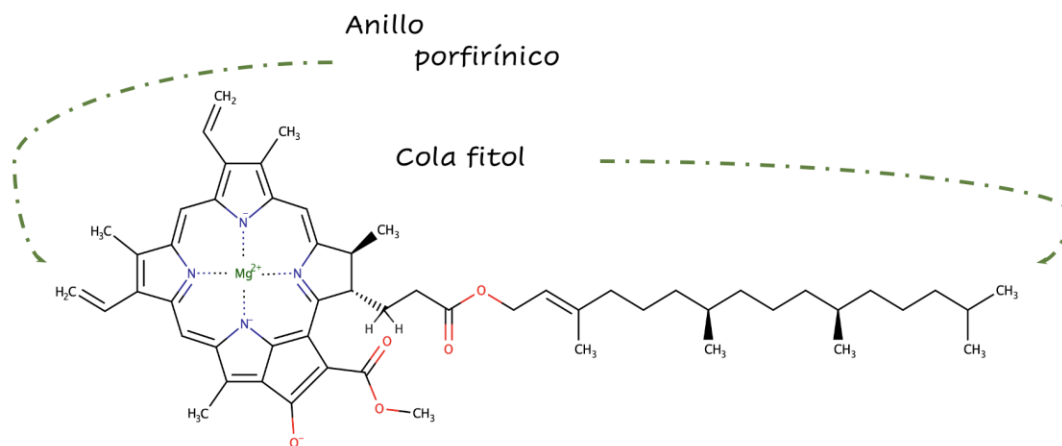
En la naturaleza se encuentran dos clases de carotenoides (figura 3B): (1) los carotenos, que consisten en hidrocarburos lineales que pueden ciclarse en un extremo o en ambos extremos de la molécula, su principal representante es el β -caroteno, y (2) las xantofilas, las cuales son derivados oxigenados de carotenos, siendo su principal representante la luteína (Hu et al., 2018). Su función dentro de la célula depende de su localización, ya que si se encuentran cerca del centro de reacción, su principal función será en el proceso de transferencia de energía; no obstante, si se encuentran embebidos en membranas o en otros compartimentos, debido a que son compuestos anfipáticos, su

principal función es la de proteger a la célula de la oxidación, esto debido a su propiedad antioxidante (Mulders et al., 2014).

Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas (FBP) son proteínas pigmentadas que se encuentran presentes en cianobacterias y algas rojas. Estas proteínas se encuentran formadas por dos unidades (figura 3C): una proteica y un pigmento denominado ficobilina. Dichas unidades se encuentran unidas mediante enlace covalente a un aminoácido cisteína. La ficobilina está compuesta por grupos prostéticos tetrapirrólicos, estos, al presentar enlaces dobles y sencillos alternados (sistema conjugado), pueden deslocalizar electrones como consecuencia de una excitación luminosa a una determinada longitud de onda (Mulders et al., 2014). Las ficobiliproteínas absorben luz en el rango verde y rojo-naranja, lo cual permite que los microorganismos que las poseen puedan realizar la fotosíntesis dentro de aguas profundas; donde sólo la luz verde penetra (Tandeau De Marsac, 2003). Actualmente se conocen diferentes tipos de FBP, las cuales se clasifican con base en la longitud de onda en la que absorben: aloficocianina B (λ_{max} 671 nm;), aloficocianina A (λ_{max} 650 nm; azul claro), ficocianina (λ_{max} 620 nm; azul), ficoeritrina (λ_{max} 500-580 nm; rojo) y ficoeritrocianina (λ_{max} 568 nm) (Bryant et al., 1979). Las diferencias entre las longitudes de absorción de las diferentes FBP se debe a pequeñas diferencias presentes en la proteína y en las estructuras de la ficobilina.

A) Clorofila A:



B) Carotenoides:

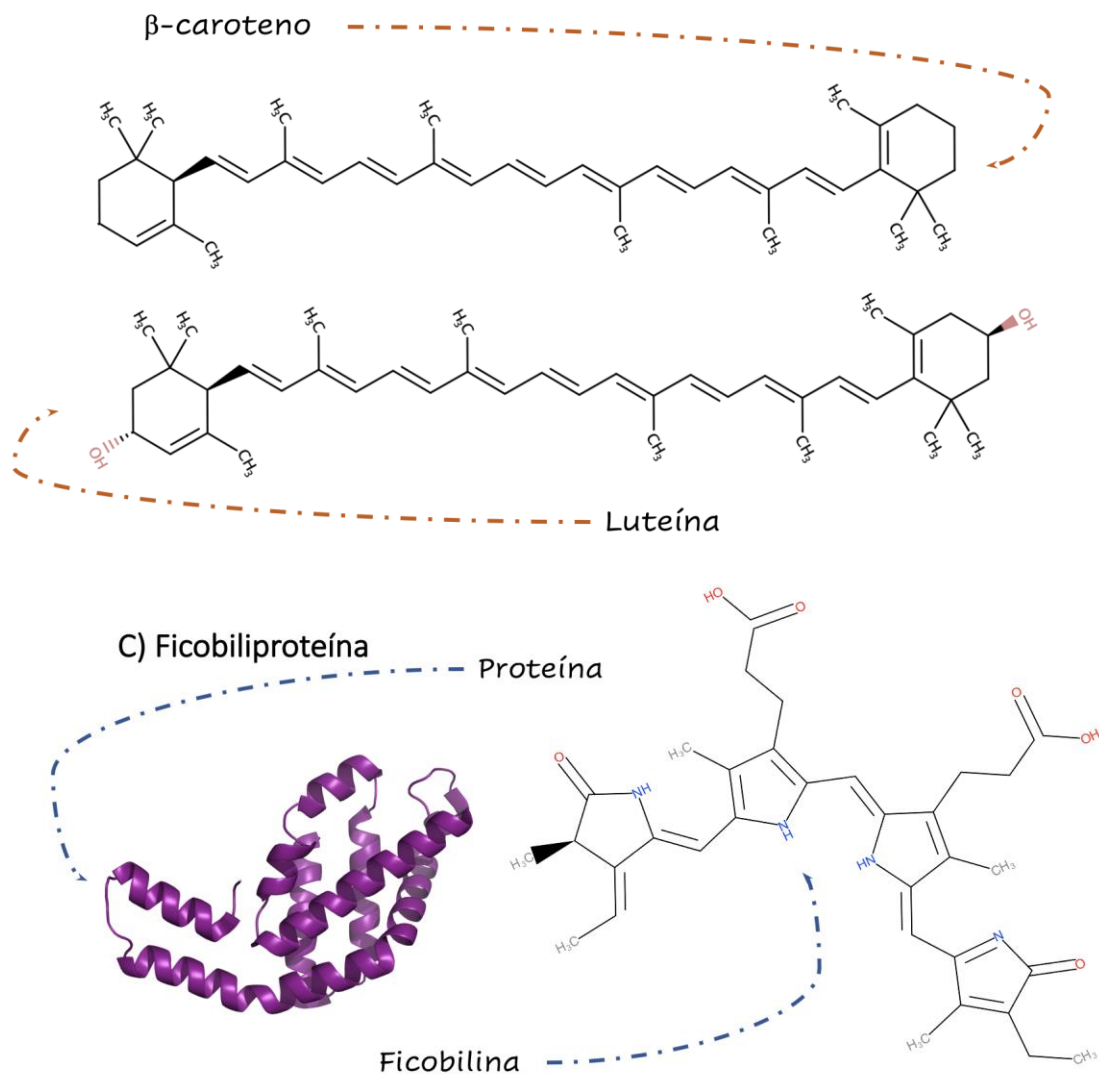


Figura 3.- Estructuras moleculares de los principales pigmentos encontrados en microalgas y cianobacterias. A) Clorofila a, B) Carotenoides y C) Ficobiliproteína.

Biosíntesis de los pigmentos

Las microalgas requieren de la energía luminosa, el dióxido de carbono y, a través de la fotosíntesis y el Ciclo de Calvin-Benson, producir glucosa para crecer. Sin embargo, para sintetizar las macromoléculas se requieren otros componentes: fuentes de nitrógeno (nitratos, nitritos, amonio y/o urea), de fosfatos y de carbono (CO_2), entre otros elementos. A partir de estos componentes las microalgas sintetizan las macromoléculas y los compuestos

requeridos para su crecimiento y supervivencia, y, como se discutirá más adelante, estos nutrientes pueden ser factores para modificar la distribución de las biomoléculas en las células incluyendo la formación de pigmentos.

Específicamente, para la síntesis de los pigmentos se conocen las vías de síntesis en plantas y algunas cianobacterias. Para la biosíntesis de la clorofila se parte de dos vías diferentes: la formación del anillo porfirínico y

la cadena fitol, para su posterior unión. La formación del anillo porfirínico se lleva a cabo en el cloroplasto (células eucariotas), y se inicia por la formación del ácido 5-aminolevulínico (ALA). La formación de este compuesto puede partir por dos vías, una es mediante la condensación de una glicina y del tioéster succinil-CoA, mientras que la otra vía consta de tres pasos partiendo del aminoácido glutamato (vía C5). La primera vía es utilizada por animales, levadura y bacterias, mientras que la vía C5 es característica de plantas superiores y cianobacterias. Partiendo del ALA se llevan a cabo reacciones de condensación, oxidación y reducción hasta dar lugar a la protoporfirina IX (figura 3A), la cual, por un proceso de quelación, integra al ion Mg^{2+} , posteriormente el grupo fitil es incorporado al anillo para dar lugar a la clorofila (figura 4A). Finalmente, las moléculas de clorofila son unidas de forma no covalente a proteínas presentes en la membrana fotosintética (Halim et al., 2010; Von Wettstein et al., 1995).

La producción de las ficobiliproteínas se realiza mediante la condensación de dos estructuras: una holoproteína y de 1 a 3 ficobilinas. La biosíntesis de la ficobilina comienza con el grupo hemo el cual, por medio de la enzima hemo-oxigenasa, conduce a la conversión del cromóforo biliverdina. Una vez formada la molécula lineal, oxigenasas específicas derivan esta molécula a las diferentes ficobilinas (figura 4A), para posteriormente ser integradas covalentemente a las holoproteínas (específicas de cada ficobiliproteína), mediante enzimas denominadas bilin-liasas (Kannaujiya et al., 2017).

Los carotenoides son una subclase de los terpenoides y para su biosíntesis comparten una molécula inicial de 5 carbonos denominada pirofosfato de isopentenilo (IPP). La síntesis del IPP deriva de dos posibles vías: 1) vía del mevalonato (MVA) la cual inicia por la condensación de dos moléculas de acetil-CoA y 2) vía del 2-C-metileritrol 4-fosfato (MEP o vía no-mevalonato), la cual inicia por condensación de una molécula de piruvato y una de gliceraldehido 3-fosfato. La mayoría de las cianobacterias utilizan exclusivamente la vía MEP, mientras que la mayoría de eucariotas y arqueas poseen sólo la vía MVA (Zhang, 2018).

Una vez generado el IPP, se llevan a cabo una serie de condensaciones hasta llegar a una molécula de 40 carbonos denominada fitoeno (caroteno incoloro), a partir de este compuesto se forman los carotenoides y, mediante reacciones de oxigenación de estos, deriva la formación de las xantofilas (figura 4B). Conocer el cómo son sintetizados estos compuestos proporciona indicios de los nutrientes, genes y proteínas que se podrían modificar, para que la vía de síntesis no se vea comprometida y conlleve a un aumento en la acumulación de los pigmentos.

Funciones de los pigmentos en los microorganismos

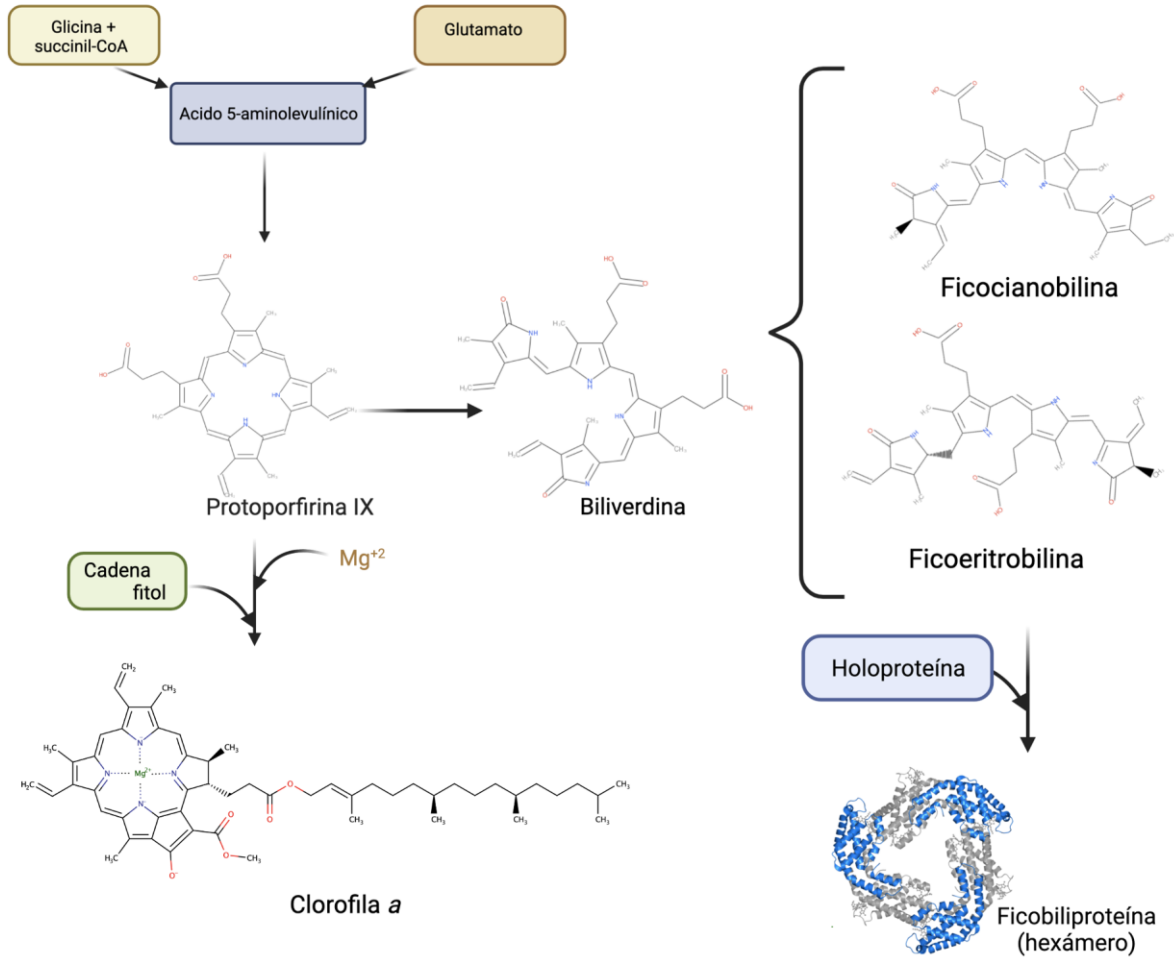
Como se ha mencionado, la principal función de los pigmentos en los organismos fotosintéticos es mejorar la captura de fotones y la translocación de estos hacia los fotosistemas; no obstante, los pigmentos también presentan la función de ser fotoprotectores, reservorio de carbono y nitrógeno. A continuación, se describirán estas dos funciones de los pigmentos.

Los pigmentos captadores de luz se pueden dividir en dos: principales y secundarios. Dentro de los principales se encuentra únicamente la clorofila *a*, ya que es el pigmento encargado de romper la molécula del agua y, por consiguiente, la liberación del protón y capturar el electrón, el cual será utilizado en la fotosíntesis para la posterior formación de energía en forma de ATP (reservorio de energía química) y formación del poder reductor (NADPH), el cual es utilizado para reducir el CO_2 en azúcares. Dentro de los pigmentos secundarios se encuentran las demás clorofilas, las ficobiliproteínas y los carotenos.

Los pigmentos que funcionan como fotoprotectores evitan el daño de la autooxidación. Para explicar el proceso de autooxidación que sufre la célula, derivado de la fotosíntesis, es necesario entender que existe una velocidad de transferencia de energía entre el centro de reacción (clorofila *a*) y la cadena transportadora de electrones. Así mismo, existe una velocidad de translocación de los fotones, desde los pigmentos hasta el centro de reacción. Cuando esta velocidad es menor que la velocidad a la cual la clorofila *a* recibe los fotones, la clorofila *a* entra en un

Artículos

A) Síntesis de clorofilas y ficobiliproteínas



B) Síntesis de carotenoides y xantofilas

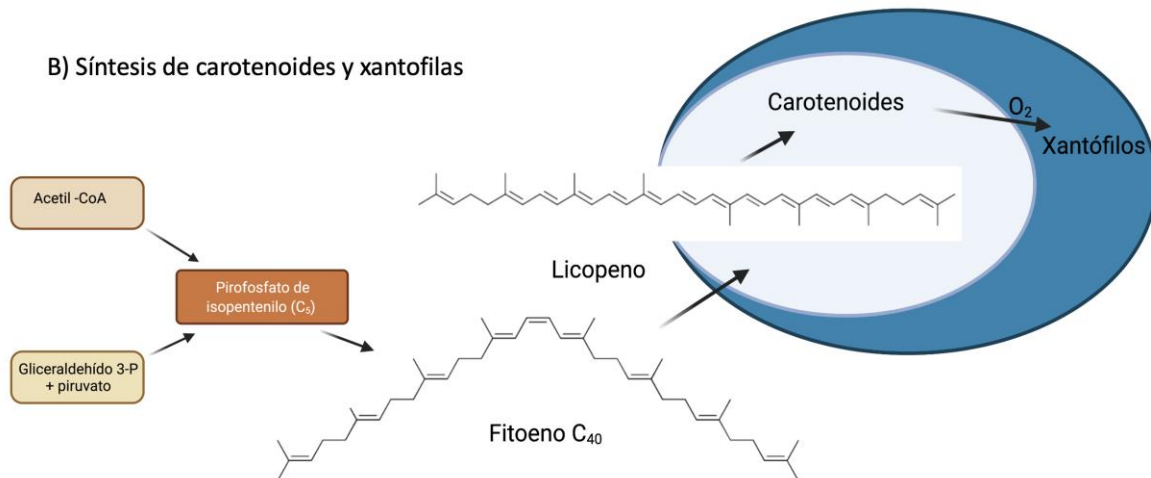


Figura 4. Biosíntesis de pigmentos A) clorofila y ficocianina B) carotenoides.

estado de oxidación (tripleto), aunque esta no es dañina por sí sola es un compuesto inestable, y transloca esta energía a una molécula de oxígeno, derivando en la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales atacan al ADN, proteínas y lípidos de membrana, conllevando a un daño celular.

Los pigmentos considerados fotoprotectores tienen como función evitar la fotooxidación derivada de la fotosíntesis y son producidos principalmente cuando hay un exceso de intensidad luminosa o altos tiempos de exposición a la luz, así como por la presencia de agentes externos oxidantes. Dentro de los pigmentos fotoprotectores hay una subdivisión, la cual, con base en su mecanismo de acción en contra de la fotooxidación, son divididas en: 1) fotoprotectores de filtrado, 2) enfriamiento y 3) barrido (Glenn, 2009).

1.- Los fotoprotectores de filtrado previenen la formación del tripleto de clorofila *a*, derivado de la sobreexcitación de la clorofila; en este mecanismo los carotenoides absorben una gran cantidad de la radiación, evitando así que llegue a los centros de reacción. Esta energía capturada puede ser guardada para su posterior uso (reservorio de electrones) o bien puede ser liberada en forma de calor, los principales pigmentos que cumplen esta función son: β -caroteno y astaxantina.

2.- Los fotoprotectores de enfriamiento previenen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Una vez que la clorofila *a* llega a su estado máximo de excitación (tripleto) y antes de que esta energía sea translocada a una molécula de oxígeno para la formación de las ROS, algunos pigmentos pueden absorber esta energía directamente de la clorofila. Los tripletes generados por esta translocación en los carotenoides presentan una energía relativamente baja, debido a que los carotenoides contienen más de 7 dobles enlaces y pueden aceptar esta energía sin causar daño a su entorno. Esta energía aceptada por los carotenoides puede ser liberada en forma de calor. Los principales carotenoides que cumplen esta función son: β -caroteno, astaxantina, luteína, zeaxantinas, violaxantina y diadinoxantina.

3.- Los fotoprotectores de barrido reaccionan con las ROS. Una vez formadas las ROS los carotenoides aceptan la energía de estas almacenándola o liberándola en forma de calor y así evitando que las ROS causen daño a las biomoléculas estructurales y funcionales. Los principales carotenoides que cumplen esta función son: β -caroteno, astaxantina y luteína.

De igual forma, los organismos no fotosintéticos pueden utilizar estos compuestos como antioxidantes y es por esto, que la producción y extracción de estos pigmentos tiene un gran mercado en la industria farmacéutica. El conocer las funciones de los pigmentos en las microalgas, es importante ya que mediante la manipulación de las condiciones del cultivo se puede incrementar la biosíntesis de estos pigmentos para su uso biotecnológico.

Factores que afectan la producción de pigmentos en microalgas

Los factores ambientales y nutricionales pueden afectar el crecimiento y composición celular de las microalgas. Se han realizados diversos estudios donde se observa que al generar un estrés en las microalgas es posible alterar el crecimiento celular e incrementar las concentraciones de los pigmentos. Algunos factores que pueden generar este estrés son: la intensidad de la luz, la longitud de onda de la luz, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, estrés oxidativo y la osmolaridad del cultivo. (Kobayashi et al., 1992; Sloth et al., 2006). A continuación, se discutirán algunas técnicas empleadas y un resumen de las técnicas usadas se muestra en la tabla 3.

Efectos de la luz

La luz tiene uno de los efectos más importantes en la producción de pigmentos en microalgas (Begum et al., 2016), ya que estos son principalmente utilizados como captadores de energía para llevar a cabo la fotosíntesis. Por lo que cambios en la intensidad de luz, longitud de onda y tiempo de exposición generan cambios en la acumulación de los pigmentos. Los tiempos cortos de exposición a la luz o intensidad de la luz conllevan a una baja captura de energía, por lo que las células incrementan el número

Artículos

Tabla 3. Estrategias utilizadas para incrementar la acumulación de los principales pigmentos en microalgas.

Pigmento	Aplicación	Microalga	Estrategias de producción	Referencia
β-caroteno	Precursor de la vitamina A, propiedades antioxidantes, previene la degeneración macular.	<i>Asterarcys quadricellulare</i>	Modificación del medio de cultivo	(Singh et al., 2019)
		<i>Dunaliella</i> sp.	Radiación UV Alta intensidad luminosa, limitación de nitrógeno y fosforo, temperaturas mayores a 15°C	(Morowvat & Ghasemi, 2016) (Mogedas et al., 2009) (Wu et al., 2016)
		<i>Scenedesmus</i> sp.	Alta intensidad luminosa	(Perez-Garcia et al., 2011)
Astaxantina	Proteger de los rayos UV, antioxidantes, colorante alimentario, mejorar las funciones del sistema inmune.	<i>Chlorella</i> sp.	Cultivo heterótrofo relación C/N =180 Modificación del medio de cultivo	(Ip & Chen, 2005) (Ip et al., 2004)
		<i>Chlorococcum</i> sp.	Estrés oxidativo (H ₂ O ₂ 0.1 mM)	(Ma & Chen, 2001)
		<i>Haematococcus pluvialis</i>	Aplicación periódica de tratamiento eléctrico	(Kim et al., 2018)
			Exposición a longitud de onda 470nm (Luz LED azul)	(Xi et al., 2016)
			Cultivo mixotrófico de dos etapas con aumento de irradiación gradual Estudio en la limitación de nitrógeno (NO ₃) Aumento en la temperatura del cultivo	(Park et al., 2014) (Orosa et al., 2005) (Tjahjono et al., 1994)
Luteína	Previene la degeneración macular por la edad, aditivo de alimentos, disminuye el riesgo de cataratas y enfermedades cardiovasculares.	<i>Coccomyxa acidophila</i>	Diferentes fuentes de nitrógeno	(Casal et al., 2011)
		<i>Scenedesmus obliquus</i>	Exposición a diferentes longitudes de onda (luz blanca vs luz monocromática roja, azul y verde)	(Ho et al., 2014)
		<i>Chlorella protothecoides</i>	Cultivo heterotrófico alimentado con fuente de nitrógeno	(Shi et al., 2002)
		<i>Chlorella minutissima</i>	Irradiación creciente en forma lineal	(Dineshkumar et al., 2016)
		<i>Chlamydomonas</i> sp.	Alta intensidad de luz Generación de estrés osmótico	(Ma et al., 2019) (Xie et al., 2019)
Clorofila	Colorante en la industria alimentaria, antioxidante.	<i>Chlorella vulgaris</i>	Utilización de luz roja	(Mohsenpour et al., 2012)
		<i>Gloeothece membranacea</i>	Utilización de luz verde	
		<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	Medio de cultivo, ciclos de luz oscuridad e intensidad de luz	(George et al., 2014)
		<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Scenedesmus obliquus</i>	Aumento del fosforo Aumento de temperatura aunado con el aumento de fosforo	(Chen et al., 2011)
Ficocianina	Marcador fluorescente, actividad hepatoprotectora, antioxidante, antiinflamatoria y neuroprotectora.	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Cultivos alimentados con glucosa Baja intensidad luminosa	(Graverholt & Eriksen, 2007) (Sloth et al., 2006)
		<i>Arthrospira platensis</i>	Estrés metabólico aunado con exceso de nitrógeno	(Manirafasha et al., 2018)
			Utilización de luz verde	(Prates et al., 2018)
Ficoeritrina	Marcador fluorescente, colorante utilizado en industria alimentaria y cosmética.	<i>Porphyridium marinum</i>	Estudio y modificación el medio de cultivo	(Gargouch et al., 2018)
		<i>Pseudanabaena</i> sp.	Utilización de luz LED verde	(Mishra et al., 2012)
		<i>Porphyridium purpureum</i>	Evaluación del tiempo de cultivo Manipulación genética para disminuir la producción de clorofila	(Xu et al., 2020) (Jeon et al., 2021)

de pigmentos antena y así la captación de la energía que llega a los fotosistemas. Es por esto que la clorofila y las ficobiliproteínas son los pigmentos mayormente influenciados por la baja exposición a la luz. En contraparte, los carotenoides, además de ser complejos antena, son principalmente sintetizados en respuesta a la presencia de especies reactivas de oxígeno o bien en respuesta a sobreexcitación de la clorofila.

Hoy en día, las luces artificiales son una herramienta utilizada en los cultivos autotróficos, ya que hacen posible controlar la longitud de onda (color de la luz), intensidad y tiempo de exposición a la luz. Se ha demostrado que se puede lograr una mayor producción de biomasa controlando la intensidad de la luz, utilizando luz artificial como los diodos emisores de luz (LED), lámparas incandescentes o tubos fluorescentes. En la actualidad, gran parte de estudios en el crecimiento de las microalgas ha sido mediante el uso de LED, ya que son de tamaño pequeño, tienen una baja disipación de energía en forma de calor, un tiempo de vida media elevada, alta eficiencia de conversión fotoeléctrica y un reducido consumo de energía.

Dentro de las técnicas utilizadas, para manipular el efecto de la luz, se encuentra la variación de la longitud de onda, la cual se fundamenta bajo la premisa que los pigmentos presentan un rango de longitud de onda en la cual la absorción de energía es mayor, siendo esta longitud diferente para cada pigmento (figura 1). Por lo que, al someter a la microalga a una longitud de onda específica, se reduce el intervalo en el cual puede captar energía y, en consecuencia, tiende a incrementar la concentración de estos pigmentos para satisfacer los requerimientos energéticos. Cabe mencionar que cada género de microalga presenta una distribución de pigmentos diferentes, por lo que si se desea aumentar específicamente la producción de algunos se deben de considerar todos los pigmentos con los que cuenta el microorganismo.

La utilización de un rango de longitud de onda específico se ha mostrado como una técnica eficiente para incrementar el contenido de pigmentos en las microalgas y cianobacterias. Tal es el caso de la cianobacteria *Pseudanabaena* sp., donde se

observó que existe una acumulación de ficoeritrina bajo la longitud de onda correspondiente al color verde y de ficocianina con longitudes de onda correspondiente al color rojo; no obstante, la producción de biomasa se vio comprometida comparada con la utilización de la luz blanca (Mishra et al., 2012). Mientras que para la cianobacteria *Arthrospira platensis* se observó que la producción de biomasa y ficocianina aumentaron en un 26% y 44%, respectivamente, utilizando concentradores solares luminiscentes bajo la longitud de onda correspondiente a la luz roja (Raeisossadati et al., 2019). Así mismo, la producción de β -caroteno y luteína en la cepa *D. salina* (Fu et al., 2013), y la biosíntesis de astaxantina en *H. pluvialis* (Xi et al., 2016), se incrementó al utilizar una combinación de luz roja y azul, debido a que las células estuvieron sometidas a diferentes longitudes de onda y no se les permitió adaptarse sola a una, generando condiciones constantes de estrés que dieron como resultado un incremento en estos pigmentos secundarios.

No es posible extrapolar directamente las técnicas utilizadas para el aumento en la producción de pigmentos a las diferentes especies de microalgas, debido a que cada microorganismo presenta una respuesta diferente a los estímulos. Por ejemplo, el grupo de Mohsenpour y colaboradores, en el 2012, estudiaron la utilización de luces monocromáticas y reportaron que, diferentes longitudes de onda, permitieron incrementar la acumulación de clorofila-*a* en cepas de *Chlorella vulgaris* y *Guzmania membranacea*, debido a que la luz roja y la luz verde, respectivamente, generan un aumento de este pigmento (Mohsenpour et al., 2012). De igual forma, en la cianobacteria *Scenedesmus obliquus* FSP-3, se observó que el uso de LED blanco resultó en una mejor eficiencia para la producción de luteína en comparación con fuentes LED monocromáticas (rojo, azul y verde) (Ho et al., 2014). Estos datos difieren con los mencionados previamente, en los cuales el uso de fuentes de luz monocromáticas aumenta la producción de pigmentos, confirmando que los requerimientos de luz son diferentes para cada microorganismo. Aunado a esto, se ha reportado que la incidencia de luz fuera del rango visible, en la cepa *Dunaliella bardawil*, generó un aumento en la producción de

carotenoides al usar luz UV-A, sin efectos negativos sobre el crecimiento celular (Mogedas et al., 2009), por lo que esta es un área de oportunidad explotable para favorecer la acumulación de pigmentos en otras microalgas.

La potencia ponderada por la longitud de onda emitida por una fuente de luz o intensidad luminosa es un factor importante para considerar en el contenido de pigmentos en microalgas. El contenido de pigmentos puede ser regulado al variar este factor; de forma general se ha observado que al disminuir la intensidad de luz hay un incremento en pigmentos secundarios (Prates et al., 2018; Sloth et al., 2006), debido a que el aporte energético disminuye por el uso de bajas intensidades luminosas y es necesario estimular la producción de más pigmentos antena y así mejorar la eficiencia fotosintética. En el otro extremo, el aumento en la intensidad de luz puede verse reflejado en un incremento en la concentración de clorofila y pigmentos fotoprotectores (George et al., 2014; Ho et al., 2014; Tomaselli et al., 1997). Probablemente, al aumentar la intensidad de luz existe una sobreexcitación y, por ende, la formación de los tripletes de alta energía en la clorofila-a, lo que deriva en la formación de estrés oxidativo y, como consecuencia, la célula promueve el incremento de los pigmentos fotoprotectores.

Una limitante en el crecimiento y en la producción de pigmentos es el efecto de sombreamiento. Este fenómeno se genera cuando existe una gran concentración de células que impiden el paso de la luz y, por lo tanto, el promedio de energía luminosa que reciben las células disminuye. El efecto de sombreamiento provoca que la luz que reciben las células sea limitada, lo que repercute negativamente en el crecimiento celular o bien en la producción de pigmentos. Para evitar este efecto existen técnicas como lo son el incremento lineal de luz, ya sea en (1) tiempo de exposición: existen cultivos que son sometidos a intervalos controlados de luz/obscuridad (fotoperiodos) y el tiempo de exposición a la luz incrementa de forma lineal (Dineshkumar et al., 2016), o bien en (2) un incremento gradual de la intensidad de luz (Ma et al., 2019). Con estas técnicas se asegura que, aunque exista un incremento de células, estas siempre se encuentran

sometidas a un exceso de luz, lo que provoca una condición de estrés para generar carotenos.

El propósito de estas técnicas es contar con condiciones que aseguren una productividad volumétrica de pigmentos elevada, mediante la obtención de una alta concentración celular, aunado a una alta acumulación de pigmentos por célula. Sin embargo, el generar un estrés celular, que conlleva a una acumulación de pigmentos, por lo general deriva en un bajo crecimiento celular y por lo tanto en una baja concentración de biomasa final (Mishra et al., 2012). Para contender con este problema se utilizan cultivos en dos fases, donde cada fase tiene un objetivo específico. En la primera fase las condiciones de cultivos son las óptimas para alcanzar una gran concentración de biomasa (normalmente en condiciones heterotróficas). Mientras que en la segunda fase las microalgas se exponen a condiciones que provocan un estrés celular y, por consiguiente, aumentan la producción de pigmentos (Azizi et al., 2019; Park et al., 2014; Wan et al., 2016), de esta manera se logra una elevada concentración de células y pigmentos. Por lo general se requiere realizar diluciones entre la primera y la segunda fase para evitar el efecto del sombreamiento.

Medio de cultivo

Las condiciones de cultivos son muy importantes para la acumulación de pigmentos, siendo los factores relacionados con la luz los que ejercen mayor influencia; sin embargo, se ha observado que los nutrientes presentes en el medio de cultivo y la proporción de estos tienen un efecto en el crecimiento y en la acumulación de algunos metabolitos.

Algunos estudios mostraron que en cultivos heterotróficos o mixotróficos, el aumentar la concentración de fuente de carbono orgánico y disminuir la concentración de fuente de nitrógeno conlleva a un incremento en el contenido de carotenos, ya que estos son generados en una respuesta a la deficiencia de nitrógeno (Ip et al., 2004; Shi et al., 2002). Por otro lado, en cultivos donde la fuente de carbono es baja y existe un exceso de la fuente de nitrógeno, se ha observado que algunas microalgas son capaces de acumular ficobiliproteínas como reservorio de nitrógeno (Sloth et al., 2006).

Diversos grupos de trabajo han reportado que el contenido de pigmentos puede variar dependiendo la fuente de carbono utilizada dentro de las cuales están la glucosa, el acetato, el malonato, entre otras; o bien, dependiendo el grado de oxidación del nitrógeno (nitratos, nitritos amonio y urea; fuente de carbono y nitrógeno). Aún se desconoce el principio de por qué al usar cierta fuente de carbono o nitrógeno, se promueve la acumulación de ciertos pigmentos (Casal et al., 2011; Manirafasha et al., 2018; Orosa et al., 2005).

En esta misma línea, varios grupos de trabajo realizan optimizaciones de cultivo. Para este tipo de estudios realizan diseños experimentales donde proponen modificar diversas variables como: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, temperatura, pH, salinidad y elementos metálicos en bajas concentraciones con un posterior estudio estadístico, donde se determinan las mejores condiciones de cultivo, con el fin de lograr una mayor producción específica y/o volumétrica de los pigmentos (Chen et al., 2011; Gargouch et al., 2018; Morowvat & Ghasemi, 2016; Singh et al., 2019).

Estrés oxidativo

Una de las principales funciones de la mayoría de los carotenos es evitar la oxidación de proteínas, lípidos y material genético, ya que reaccionan con las especies reactivas de oxígeno generadas en la fotosíntesis antes de que estas lleguen a las biomoléculas vitales. Por esta razón, se ha evaluado el efecto del estrés oxidativo en la producción de carotenos y se ha observado que, cuando hay un aumento en la producción de ROS, se promueve un incremento en la producción de carotenos. Para poder generar especies de oxígeno y por ende llevar a las células a un estrés oxidativo la principal técnica es incrementar la intensidad de luz (Xie et al., 2019) y así desestabilizar el flujo de energía en el procesos fotosintético. Sin embargo, existen otras técnicas como la de generar estrés oxidativo por medio de la adición de iones metálicos, o bien peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Un caso muy particular es la generación de astaxantina en configuración-trans, la cual puede ser aumentada en la microalga verde *Chlorococcum* sp. por medio de la adición de H_2O_2 (0.1 mM), obtenido un rendimiento 60% mayor en comparación con un cultivo mixotrófico (Ma & Chen, 2001).

Otros mecanismos de estrés para la producción de pigmentos

Actualmente se han estudiado otras técnicas para incrementar la concentración de pigmentos, entre ellas está la aplicación periódica de tratamiento eléctrico, con la cual se genera la electrólisis del agua y por lo tanto la formación de ROS, mediante un tratamiento con 100 mA se logró un incremento del 10% de astaxantina en la cepa *H. pluvialis* (Kim et al., 2018). Otro factor que se ha observado incrementa el contenido de pigmentos es la temperatura: En cepas de *H. pluvialis* (Tjahjono et al., 1994) y *C. protothecoides*, (Shi et al., 2002) al aumentar la temperatura, presentaron un incremento del 300% y 20% el contenido de astaxantina y luteína, respectivamente. Para el caso de la clorofila, también se observó que la temperatura ocasionó modificaciones en el tamaño de las células y la cantidad de clorofila-a (Chen et al., 2011). Para las ficobiliproteínas se ha observado que un factor importante es el tiempo de cultivo ya que para las cepas *P. purpureum* (Xu et al., 2020) y *Pseudanabaena* sp. (Mishra et al., 2012), se observó que existe un pico en la acumulación de ficoeritrina aproximadamente a las 13 días en un cultivo autotrófico.

Por último, una de las técnicas para la producción de metabolitos más utilizada en diversos microorganismos es la manipulación genética; sin embargo, debido a que existe poca información de las secuencias de las microalgas y las técnicas que existen están muy especializadas para otros modelos celulares, principalmente otros microorganismos, la utilización de estas técnicas se encuentra poco desarrollada para microalgas. Un ejemplo interesante fue la eliminación de genes involucrados en la biosíntesis de la clorofila en la cepa *Porphyridium* sp. lo que incrementó la producción de ficoeritrina (Jeon et al., 2021).

Cabe mencionar que, los procedimientos aquí descritos, dan una idea general del efecto observado en las microalgas. No obstante, cada cepa tiene sus características particulares, inclusive entre mismas especies de cepas, pero aisladas de diferentes nichos, puede haber diferencias en la acumulación de pigmentos, y en sus características de crecimiento (Shi et al., 1997).

Conclusiones

La clorofila, ficobiliproteínas y carotenoides son pigmentos de interés comercial por la diversidad de colores que presentan y gracias a su capacidad antioxidante y su naturaleza no tóxica ofrecen muchos beneficios a la salud como productos nutraceuticos. Por tales motivos se ha buscado incrementar la producción de estos pigmentos; adicionalmente, debido al alto contenido de biocolorantes, la gran versatilidad y el rápido crecimiento que presentan en comparación con plantas superiores se ha propuesto a las microalgas como fuente de estos pigmentos. Es por esta razón que la estructura, biosíntesis y funciones de los pigmentos en microalgas se ha estudiado de forma detallada y, con la información generada, se ha podido proponer y realizar optimizaciones en la producción de estos colorantes. Todos los enfoques para la sobreproducción de pigmentos evaluados en esta revisión (efectos de la luz, composición del medio de cultivo, estrés oxidativo, temperatura, etc.) son resultado de respuestas en las vías biosintéticas. Y, aunque se han logrado varios avances en la productividad de diferentes pigmentos, aún es necesario mejorar estrategias de cultivo y desarrollar técnicas basadas en biología molecular e ingeniería metabólica para mejorar los rendimientos y productividades.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento otorgado por la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM: IT201119. FVLP recibió una beca de posgrado de CONACyT.

Referencias

- Azizi, M., Hejazi, M.A., Hashemi, M., 2019. Supplementation with polyalcohols and sequential mixotrophy dilution photoinduction strategy boost the accumulation of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*. *Aquaculture* 511,734225. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734225>
- Begum, H., Yusoff, F.M.D., Banerjee, S., Khatoon, H., Shariff, M., 2016. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 2209–2222. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.764841>
- Bryant, D.A., Guglielmi, G., de Marsac, N.T., Castets, A.M., Cohen-Bazire, G., 1979. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Arch. Microbiol.* 123, 113–127. <https://doi.org/10.1007/BF00446810>
- Carotenoids, volume 4: Natural functions, 1377. <https://doi.org/10.1007/978-3-7643-7499-0>
- Casal, C., Cuaresma, M., Vega, J.M., Vilchez, C., 2011. Enhanced productivity of a lutein-enriched novel acidophile microalga grown on urea. *Mar. Drugs* 9, 29–42. <https://doi.org/10.3390/md9010029>
- Chen, M., Li, J., Dai, X., Sun, Y., Chen, F., 2011. Effect of phosphorus and temperature on chlorophyll a contents and cell sizes of *Scenedesmus obliquus* and *Microcystis aeruginosa*. *Limnology* 12, 187–192. <https://doi.org/10.1007/s10201-010-0336-y>
- De Carvalho, J.C., Cardoso, L.C., Ghiggi, V., Woiciechowski, A.L., De Souza Vandenberghe, L.P., Soccol, C.R., 2014. Microbial pigments. Biotransformation Waste Biomass into High Value Biochem. 9781461480, 73–97. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8005-1_4
- De Mejia, E.G., Zhang, Q., Penta, K., Eroglu, A., Lila, M.A., 2020. The Colors of Health: Chemistry, Bioactivity, and Market Demand for Colorful Foods and Natural Food Sources of Colorants. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 11, 145–182. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051729>

- Dineshkumar, R., Subramanian, G., Dash, S.K., Sen, R., 2016. Development of an optimal light-feeding strategy coupled with semi-continuous reactor operation for simultaneous improvement of microalgal photosynthetic efficiency, lutein production and CO₂ sequestration. *Biochem. Eng. J.* 113, 47–56.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.05.011>
- Fu, W., Guomundsson, Ó., Paglia, G., Herjólfsson, G., Andrésón, Ó.S., Pálsson, B.O., Brynjólfsson, S., 2013. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2395–2403.
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4502-5>
- Gargouch, N., Karkouch, I., Elleuch, J., Elkahoui, S., Michaud, P., Abdelkafi, S., Laroche, C., Fendri, I., 2018. Enhanced B-phycoerythrin production by the red microalga *Porphyridium marinum*: A powerful agent in industrial applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 120, 2106–2114.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.037>
- George, B., Pancha, I., Desai, C., Chokshi, K., Paliwal, C., Ghosh, T., Mishra, S., 2014. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* - A potential strain for bio-fuel production. *Bioresour. Technol.* 171, 367–374.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.086>
- Graverholt, O.S., Eriksen, N.T., 2007. Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 69–75.
<https://doi.org/10.1007/s00253-007-1150-2>
- Halim, R., Hosikian, A., Lim, S., Danquah, M.K., 2010. Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects. *Int. J. Chem. Eng.* 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/391632>
- Ho, S.H., Chan, M.C., Liu, C.C., Chen, C.Y., Lee, W.L., Lee, D.J., Chang, J.S., 2014. Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. *Bioresour. Technol.* 152, 275–282.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.031>
- Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J.S., Lee, D.J., 2018. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnol. Adv.* 36, 54–67.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.009>
- Ip, P.F., Chen, F., 2005. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Process Biochem.* 40, 733–738.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.039>
- Ip, P.F., Wong, K.H., Chen, F., 2004. Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture. *Process Biochem.* 39, 1761–1766.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.08.003>
- Jeon, M.S., Han, S. II, Jeon, M., Choi, Y.E., 2021. Enhancement of phycoerythrin productivity in *Porphyridium purpureum* using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 ribonucleoprotein system. *Bioresour. Technol.* 330, 124974.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124974>
- Kannaujiya, V.K., Sundaram, S., Sinha, R.P., 2017. Phycobiliproteins: Recent developments and future applications, Phycobiliproteins: Recent Developments and Future Applications.
<https://doi.org/10.1007/978-981-10-6460-9>
- Kim, J.Y., Lee, C., Jeon, M.S., Park, J., Choi, Y.E., 2018. Enhancement of microalga *Haematococcus pluvialis* growth and astaxanthin production by electrical treatment. *Bioresour. Technol.* 268, 815–819.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.014>

- Kobayashi, M., Kakizono, T., Yamaguchi, K., Nishio, N., Nagai, S., 1992. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 74, 17–20. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90261-R](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90261-R)
- Ma, R., Zhao, X., Xie, Y., Ho, S.H., Chen, J., 2019. Enhancing lutein productivity of *Chlamydomonas* sp. via high-intensity light exposure with corresponding carotenogenic genes expression profiles. *Bioresour. Technol.* 275, 416–420. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.109>
- Ma, R.Y.N., Chen, F., 2001. Enhanced production of free trans-astaxanthin by oxidative stress in the cultures of the green microalga *Chlorococcum* sp. *Process Biochem.* 36, 1175–1179. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00157-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00157-1)
- Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana, T., Rashid Ahmed, N., Liu, J., Lu, Y., Zeng, X., Ling, X., Jing, K., 2018. Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. *Bioresour. Technol.* 255, 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.068>
- Mass, O., Taniguchi, M., Ptaszek, M., Springer, J.W., Faries, K.M., Diers, J.R., Bocian, D.F., Holten, D., Lindsey, J.S., 2011. Structural characteristics that make chlorophylls green: Interplay of hydrocarbon skeleton and substituents. *New J. Chem.* 35, 76–88. <https://doi.org/10.1039/c0nj00652a>
- Mezzomo, N., Ferreira, S.R.S., 2016. Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: A review. *J. Chem.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3164312>
- Mishra, S.K., Shrivastav, A., Maurya, R.R., Patidar, S.K., Haldar, S., Mishra, S., 2012. Effect of light quality on the C-phycoerythrin production in marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. isolated from Gujarat coast, India. *Protein Expr. Purif.* 81, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.011>
- Mogedas, B., Casal, C., Forján, E., Vilchez, C., 2009. β -Carotene production enhancement by UV-A radiation in *Dunaliella bardawil* cultivated in laboratory reactors. *J. Biosci. Bioeng.* 108, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.02.022>
- Mohsenpour, S.F., Richards, B., Willoughby, N., 2012. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Bioresour. Technol.* 125, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.072>
- Morowvat, M.H., Ghasemi, Y., 2016. Culture medium optimization for enhanced β -carotene and biomass production by *Dunaliella salina* in mixotrophic culture. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 7, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.06.008>
- Mulders, K.J.M., Lamers, P.P., Martens, D.E., Wijffels, R.H., 2014. Phototrophic pigment production with microalgae: Biological constraints and opportunities. *J. Phycol.* 50, 229–242. <https://doi.org/10.1111/jpy.12173>
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A., Abalde, J., 2005. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.* 96, 373–378. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.04.006>
- Park, J.C., Choi, S.P., Hong, M.E., Sim, S.J., 2014. Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 2039–2047. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1180-y>
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.* 45, 11–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Prates, D. da F., Radmann, E.M., Duarte, J.H., Morais, M.G. de, Costa, J.A.V., 2018. *Spirulina* cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. *Bioresour. Technol.* 256, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.122>

- Raeisossadati, M., Moheimani, N.R., Parlevliet, D., 2019. Red and blue luminescent solar concentrators for increasing *Arthrospira platensis* biomass and phycocyanin productivity in outdoor raceway ponds. *Bioresour. Technol.* 291, 121801. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121801>
- Shi, X.M., Chen, F., Yuan, J.P., Chen, H., 1997. Heterotrophic production of lutein by selected *Chlorella* strains. *J. Appl. Phycol.* 9, 445–450. <https://doi.org/10.1023/A:1007938215655>
- Shi, X.M., Jiang, Y., Chen, F., 2002. High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. *Biotechnol. Prog.* 18, 723–727. <https://doi.org/10.1021/bp0101987>
- Singh, D.P., Khattar, J.S., Rajput, A., Chaudhary, R., Singh, R., 2019. High production of carotenoids by the green microalga *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 under optimized culture conditions. *PLoS One* 14, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221930>
- Sloth, J.K., Wiebe, M.G., Eriksen, N.T., 2006. Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.010>
- Tandeau De Marsac, N., 2003. Phycobiliproteins and phycobilisomes: The early observations. *Photosynth. Res.* 76, 193–205. https://doi.org/10.1007/1-4020-3324-9_43
- Tjahjono, A., Hayama, Y., Kakizono, 1994. Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures 16, 133–138.
- Tomaselli, L., Boldrini, G., Margheri, M.C., 1997. Physiological behaviour of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* during acclimation to changes in irradiance. *J. Appl. Phycol.* 9, 37–43. <https://doi.org/10.1023/A:1007956210329>
- Tuli, H.S., Chaudhary, P., Beniwal, V., Sharma, A.K., 2015. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *J. Food Sci. Technol.* 52, 4669–4678. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1601-6>
- Von Wettstein, D., Gough, S., Kannangara, C.G., 1995. Chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell* 7, 1039–1057. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1039>
- Wan, M., Wang, Z., Zhang, Z., Wang, J., Li, S., Yu, A., Li, Y., 2016. A novel paradigm for the high-efficient production of phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. *Bioresour. Technol.* 218, 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.045>
- Wu, Z., Duangmanee, P., Zhao, P., Ma, C., 2016. The effects of light, temperature, and nutrition on growth and pigment accumulation of three *dunaliella salina* strains isolated from saline soil. *Jundishapur J. Microbiol.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.5812/jjm.26732>
- Xi, T., Kim, D.G., Roh, S.W., Choi, J.S., Choi, Y.E., 2016. Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel LED wavelength shift strategy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 6231–6238. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7301-6>
- Xie, Y., Lu, K., Zhao, X., Ma, R., Chen, J., Ho, S.H., 2019. Manipulating Nutritional Conditions and Salinity-Gradient Stress for Enhanced Lutein Production in Marine Microalga *Chlamydomonas* sp. *Biotechnol. J.* 14, 1–28. <https://doi.org/10.1002/biot.201800380>
- Xu, Y., Jiao, K., Zhong, H., Wu, S., Ho, S.H., Zeng, X., Li, J., Tang, X., Sun, Y., Lin, L., 2020. Induced cultivation pattern enhanced the phycoerythrin production in red alga *Porphyridium purpureum*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 43, 347–355. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02230-6>
- Zhang, C., 2018. Biosynthesis of Carotenoids and Apocarotenoids by Microorganisms and Their Industrial Potential. *Prog. Carotenoid Res.* <https://doi.org/10.5772/intechopen.79061>