

# **Incremento al Valor Agregado de Salmónidos a Través de su Pigmentación con Colorantes Naturales**

Genoveva Ingle de la Mora

Instituto Nacional de la Pesca Pitágoras 1320 3er Piso Col. Santa Cruz Atoyac,  
Delegación Benito Juárez. C.P. 03310, México, D. F.  
Tels.: 5422-3053, 54223054, Fax: 5688-4014. correo-e: [inglegenoveva@hotmail.com](mailto:inglegenoveva@hotmail.com).

## **RESUMEN**

En general es aceptado que el color de los salmónidos es uno de los más importantes parámetros de calidad. Este color se debe a la incorporación de carotenoides de origen dietario, por lo tanto en las granjas de cultivo de estas especies se debe proporcionar la coloración roja-rosado a los peces, con la finalidad de satisfacer las expectativas del consumidor. Las principales fuente de pigmentos en la dieta de salmonidos cultivados son la astaxantina y la cantaxantina sintética, los cuales son utilizados debido a su eficiente pigmentación y depositación, pero a un alto costo. Esto ha promovido la búsqueda de nuevas fuentes pigmentantes de menor costo. En el presente trabajo se reseña los principales resultados obtenidos por incorporar a la dieta astaxantina extraída de desechos de camarón, levaduras, algas y plantas. Cada una de estas fuentes pigmentantes presenta dificultades para su utilización comercial y la coloración obtenida por su utilización no alcanza los resultados obtenidos con el uso de pigmentos sintéticos.

## **INTRODUCCIÓN**

Un criterio fundamental de aceptación de salmónidos es el impacto visual dado por la coloración rojo-rosado, rojo- anaranjado de la carne, los consumidores tienen preferencias por los productos rojo-coloreados de peces salmónidos (Ostrander *et al.*, 1976; Hatano *et al.*, 1987; Gormley, 1992; Rounds *et al.*, 1992; Sigurgisladottir *et al.*, 1994; Skonberg *et al.*, 1998), la coloración rojiza contribuye significativamente a la imagen de carne de salmónidos, y puede tener un gran valor, señalado como indicador de calidad del producto (Sylvia *et al.*, 1995, 1996). Esta característica es distintiva de este grupo, lo que contribuye a darle un sello de exclusividad a su imagen, a diferencia de otros productos alimenticios de origen animal que son juzgados básicamente por su sabor, textura etc. Consecuentemente, el grado de pigmentación de la carne es un factor preponderante en la determinación del precio que alcance este producto en el mercado, en cualquier forma de presentación.

Los peces salmónidos no pueden sintetizar carotenoides *de novo*, ellos deben obtenerlo de su dieta. La coloración de la carne de estos peces anádromos es obtenido en condiciones silvestres por la absorción y depósito de carotenoides oxigenados provenientes de la dieta, (Andre, 1926; Kanemitsu & Aoe, 1987; Meyers, 1994; Storebakken & No, 1992). Los

carotenoides pueden ser sintetizados solamente por los organismos autótrofos (Fitoplancton y microalgas) ocasionalmente por algunas levaduras, hongos y líquenes. En las granjas de cultivo, la disponibilidad natural de pigmentos contenidos en los ingredientes de los alimentos es reducida, por consiguiente, los carotenoides, deben agregarse como suplemento dietético al alimento balanceado, para obtener el color y tono deseado por bioacumulación (Storebakken & No, 1992). Los carotenoides encontrados en salmónidos debido a una biosíntesis pigmentaria (oxidación o reducción) corresponden básicamente a astaxantina (3,3'-dihidroxi- 4,4' -diceto- $\beta$ -caroteno) y cantaxantina (4,4'-diceto- $\beta$ -caroteno) (Steven, 1949), aunque también están presentes en menores concentraciones tisulares adenorrubina, zeaxantina, luteína,  $\beta$ -caroteno y otros compuestos carotenoides (Hata & Hata, 1973; Gentles & Haard, 1991).

En el ámbito mundial, el cultivo comercial de varias especies de salmónidos, representó en la última década una de las áreas de mayor expansión de la acuicultura, principalmente en Europa, Norteamérica y Chile, como consecuencia se generó una gran demanda por fuentes pigmentantes. Los pigmentos sintéticos astaxantina Carophyll pink (Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland) y Luncanthan pink (BASAF) y cantaxantina Carophyll red (Hoffman-La Roche) y Lucanthad red (BASAF) son los productos que se utilizan con mayor regularidad en la pigmentación de salmónidos. Más utilizados para pigmentar. El empleo de estos pigmentos ha sido exitoso porque pueden incorporarse a la dieta en concentraciones de acuerdo al nivel de coloración deseado, ya que son productos estandarizados, con una alta concentración de carotenoides y de fácil manejo. Sin embargo, el costo de la incorporación a la dieta de los salmónidos representa entre el 10 y el 25% del costo total del alimento (Spinelli *et al.*, 1974; Torrissen *et al.*, 1989; Johnson & An, 1991).

El atractivo económico de este mercado, además de los altos costos debidos a la suplementación de las dietas con carotenoides especialmente sintéticos, ha propiciado que los temas a investigar se centren principalmente en investigaciones que abordan aspectos como el conocimiento de los factores que influyen en la pigmentación (especie, tamaño, edad, composición de la dieta, tasa de incorporación en la dieta) su metabolismo, los mecanismos involucrados en su absorción, depositación y en fuentes alternativas de pigmentos aplicables en acuicultura, que sean más económicas, que contengan concentraciones elevadas de pigmentos y presenten calidad constante. En este último aspecto se centra el presente trabajo que pretende mostrar un panorama general de las fuentes de pigmentos no sintéticas utilizadas en salmónidos.

## **INSUMOS PIGMENTANTES**

### ***Pigmentos Sintéticos***

La pigmentación muscular de salmónidos, por carotenoides es afectada por la fuente de pigmentos dietarios, nivel de dosificación, duración de la alimentación y composición dietaria. A la fecha, los principales insumos pigmentantes utilizados comercialmente son la cantaxantina, producido por síntesis química por los laboratorios Hoffman La Roche y

empleado desde 1964 como agente colorante en productos alimenticios en Europa y Canadá y astaxantina sintetizado por los mismos laboratorios y el primer carotenoide aprobado a principio de los noventa como suplemento en alimento de peces en Norteamérica, Europa, Canadá y Japón. La producción de estos pigmentos se realiza por un pequeño número de compañías multinacionales especialistas en este tipo de proceso.

Ambos pigmentos son costosos, se utilizan solos o en combinación. La capacidad de retención, definida como la proporción de lo ingerido que es retenido en la carne, se estima entre un 4 al 20% (Torrissen *et al.*, 1989; Bjerkgeng *et al.*, 1990). Se ha establecido que el contenido de estos pigmentos en la dieta no debe exceder los 50 mg/ kg debido a que la tasa de retención, disminuye al incrementarse el nivel de carotenoides dietarios (Torrissen, 1985). La similitud en tono e intensidad de color con el que presentan los salmónidos silvestres, su estabilidad en la carne cuando es sometida a proceso de congelación, su disponibilidad en forma de peletizado seco entre otras, hace que la astaxantina sintética sea a pesar de su precio la principal fuente de pigmento para salmónidos.

Las investigaciones más recientes sobre astaxantina sintética se centran principalmente, en la mezcla de sus isómeros, digestibilidad y efectos metabólicos en salmónidos. (Bjerkgeng *et al.*, 1997a, 2000 a).

### ***Desechos de Crustáceos***

La astaxantina en su forma libre, esterificada o formando complejos con proteínas, es el carotenoide más abundante en los crustáceos, siendo estos la fuente natural de pigmentos para los salmónidos silvestres. La astaxantina de este origen, ha sido evaluada como una fuente pigmentante, incorporando organismos como el camarón, *Penaeus japonicus* (Peterson *et al.*, 1966; Saito & Regier, 1971; Kamata, 1977; Choubert & Luquet, 1983), Copépodos *C. Finmarchicus* (Lambertsen & Braekkan, 1971), langostilla, *Pleuroncodes planipes* (Spinelli *et al.*, 1974; Spinelli & Mahnken, 1978; Wilkie, 1972; Coral *et al.*, 1998), el Krill, *Euphasia sp.* (Lambertsen & Braekkan, 1971; Ugleveit, 1974; Ellis, 1979; Scott *et al.*, 1994), el acocil, *Procambarus clarkii* (Meyers & Bligh, 1981; Meyers *et al.*, 1990; Omara-Alwala *et al.*, 1985) a las dietas en forma fresca o deshidratada, produce pigmentación de la carne de diferentes grados de intensidad.

Se han realizado numerosos estudios para evaluar la utilización de los productos derivados del camarón y otros crustáceos como fuente pigmentante para las empresas salmoneras. (Binkowski *et al.*, 1993) ya que se estima que a nivel mundial se genera una gran cantidad (1000 000 000 ton) de residuos anuales, que consisten en el caparazón y la carne adherida a este, las vísceras y la cabeza. Estos esfuerzos han resultado infructuosos porque los desechos presentan un alto contenido de humedad, cenizas y quitina, bajo contenido de proteínas y una baja y variable concentración de pigmento (0 a 200 ppm de astaxantina), lo que dificulta incorporar los residuos de la industria de crustáceos directamente a dietas peletizadas de salmónidos (Torrissen *et al.*, 1989, Meyers 1977; Simpson & Haard, 1985).

Harinas y extractos de aceites de crustáceos que contienen carotenoides también han sido investigados con resultados variables, lo cual ha dependido del contenido de pigmento en los desechos y el método con el cual estos pigmentos han sido extraídos, hay procesos de extracción que producen isómeros y derivados de astaxantina, que no pueden ser absorbidos por los salmónidos (Torrissen *et al.*, 1989).

Hasta la fecha el aprovechamiento de estos productos como fuentes de pigmentos para la industria salmonera de cultivo no ha sido posible, el uso de estas fuentes pigmentantes va a depender de los costos implicados de producción y del nivel y la disponibilidad de la astaxantina presente en ellos.

### **Levaduras**

Una de las alternativas más promisorias para la pigmentación de salmónidos es la levadura *Phaffia rhodozyma* (Gentles & Haard, 1991; Binkowski *et al.*, 1993; Tangerás & Slinde, 1994; Choubert *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1977; 1980; 1991). El alto contenido de astaxantina y el desarrollo de la tecnología que sustenta su cultivo, hacen posible esta opción.

La síntesis de pigmentos carotenoides es una característica de varias especies de levaduras. En general estas levaduras pertenecen a los géneros *Rhodotorula sanneii* (evaluada sin buenos resultados como insumo pigmentante, en trucha arcoiris por (Savoleinen & Gylleberg, 1970), *Rhodospiridium banno*, *Sporobolomyces kluyver y van niel*, *Cryptococcus y Phaffia rhodozyma*. Aunque existen otras levaduras que normalmente no sintetizan pigmentos pero pueden ser inducidas a hacerlo (Miller *et al.*, 1976).

La levadura *Phaffia rhodozyma* pertenece a la familia *Cryptococaceae* que sintetizan, además de pigmentos,  $\beta$  y  $\gamma$  carotenos a partir de la fermentación de azúcares. De los pigmentos que sintetiza esta levadura el 83% a 87% corresponde a 3R-3R' isómeros astaxantina, a concentraciones tan altas como 1% o más de su materia seca, (Haard, 1988; An *et al.*, 1989), el resto corresponde a foenicaxantina y otros carotenoides menos importantes (Andrewes *et al.*, 1976). Además, esta levadura se caracteriza por tener una pared celular compuesta principalmente por quitina (N -acetilglucosamina unidas por enlaces  $\beta$ 1-4 glucosídicos, como la celulosa) aunque también se encuentran polisacáridos unidos a proteínas ricas en cistina y lípidos) (Castro & Mena, 1994).

La cepa silvestre de la levadura *Phaffia rhodozyma* puede contener entre 30 y 800 mg de astaxantina libre /kg levadura seca (Markovits, 1991) y en la actualidad mediante programas de selección y aislamiento de cepas mutantes, se ha llegado a concentraciones de 3.000 o más ppm de astaxantina de fermentación industrial (Johnson, 1989).

Otra característica importante de esta levadura es su aporte nutritivo, el cual también va a depender, en cierta medida, de la cepa, condiciones y medios de cultivos utilizados. Johnson *et al.* (1980) indican que en comparación con otras levaduras la *Phaffia rhodozyma*. Tiene un bajo contenido de proteínas, aunque con un buen balance de

aminoácidos esenciales para salmónidos (excepto metionina), un alto contenido de lípidos (con predominio de los ácidos palmítico, oleico y linoleico) que incluso podrían promover la absorción intestinal de la astaxantina, y un alto contenido de vitaminas del complejo B, especialmente niacina (1,520 ppm) (Castro & Mena, 1994).

Los estudios preliminares de la utilización de esta levadura como insumo pigmentante fueron realizados por Johnson *et al.* (1980) en truchas arco iris alimentadas durante 42 días con dietas secas peletizadas. Estas dietas fueron suplidas con *Phaffia rhodozyma* entera o con *Phaffia rhodozyma* con su pared celular rupturada por métodos mecánicos, químicos o enzimáticos. De acuerdo a los resultados obtenidos, estos investigadores sugieren que aparentemente para un eficiente depósito del pigmento en la trucha se requiere de una disrupción mecánica (mediante homogeneización a 10,000 psi, libras por pulgada cuadrada, o moliendo con esferas de vidrio) o enzimática (hidrólisis de la pared celular usando preparados enzimáticos de *Bacillus circulans*) de la pared celular de la levadura. Así mismo determinaron que métodos químicos como digestión con HCL, a menudo, producen destrucción de los carotenoides y nutrientes, y en consecuencia no serían un método viable de utilizar.

Gentles & Haard (1991) utilizaron tratamientos de levadura *Phaffia rhodozyma* intactos con una concentración de 112 mg/kg de astaxantina en cuatro presentaciones molido mecánico, tratamiento enzimático, secado por aspersión, carotenoides extraídos y una dieta libre de pigmentos, para alimentar a trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) durante 8 semanas. Obteniendo un nivel de pigmentación mayor en piel y tejido muscular para el molido mecánico, seguido por el tratamiento enzimático, el secado por aspersión, y carotenoides extraídos y por último la dieta libre de pigmentos. La coloración obtenida al utilizar la dieta de secado por aspersión no coincide con la aseveración de que la astaxantina no es asimilada por la trucha arcoiris de la levadura en forma intacta.

Choubert *et al.* (1995) compararon extractos de *Phaffia rhodozyma*, astaxantina sintética y cantaxantina sintética en concentraciones de 50-100 mg/kg en la dieta. Se evaluó la utilización en trucha arcoiris a través de aspectos metabólicos y digestivos, además de evaluar el color inducido por los diferentes pigmentos, retención y digestibilidad. Concluyendo que la astaxantina sintética, es mejor utilizada por trucha arcoiris en términos de pigmentación muscular y retención mientras que la cantaxantina y el extracto de *Phaffia* mostraron un comportamiento similar, aún cuando la concentración utilizada del extracto de levadura fue de 50 mg/Kg, presentando una mayor digestibilidad la dieta adicionada con *Phaffia*.

Resultados similares encontraron Coral *et al.* (1998), al incorporar extractos de astaxantina de langostilla en extracto de aceite de bacalao, *Phaffia rhodozyma* y astaxantina sintética en el alimento de trucha arcoiris en concentraciones de 75 mg de pigmento por kg de alimento. y evaluar concentración de astaxantina y color muscular encontrando resultados similares entre el depósito de astaxantina de langostilla en el músculo de trucha, así como cromaticidad roja (a\*) del tejido, a los obtenidos con la levadura *Phaffia rhodozyma*, pero menores con respecto a la astaxantina sintética.

Esta fuente de pigmentación promete ser una de las alternativas más promisorias para la pigmentación de salmónidos (Tangerás & Slinde, 1994), enfatizando la creciente biodisponibilidad de fuentes de carotenoides microbianas. (Bjerkeng, 2000).

### *Algas*

Los carotenoides son sintetizados de *novo* por todos los organismos fotosintéticos, incluyendo las cianobacterias, y ocasionalmente por las bacterias no-fotosintéticas y líquenes. En el mundo marino la síntesis de carotenoides se lleva a cabo esencialmente por el fitoplancton: microalgas, cianobacterias y otros organismos autótrofos, así como las microfitas y macrofitas bénticas (Young & Briton, 1993). Los carotenoides están ampliamente distribuidos en las diferentes divisiones de algas, sin embargo, la mayor diversidad se presenta en las clorofitas, en las cuales la localización de la astaxantina, como metabolito de alto valor agregado, está en función de las condiciones de cultivo específicamente temperatura e intensidad luminosa. (Grung & Liaaen-Jensen, 1993).

En agua dulce, el alga verde unicelular *Haematococcus pluvialis* ha sido reconocida durante muchos años como un acumulador del carotenoide astaxantina, (Goodwin & Jamirkon, 1954; Czygan, 1968; Grung *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1991; Barbosa *et al.*, 1999; Lorenz & Cysewski, 2000), bajo ciertas condiciones de stress, tales como alta irradiación, limitación de nitrógeno, las células de esta alga forma quistes y acumula en el citoplasma cantidades masivas de astaxantina a tal magnitud que el color cambia de verde a rojo (Goodwin & Jamirkon, 1954; Borowitzka *et al.*, 1991; Yong & Lee, 1991; Boussiba *et al.*, 1992; Fan *et al.*, 1994). Esta alga ha recibido recientemente mucha atención debido a su capacidad de sintetizar y acumular grandes cantidades de astaxantina durante y al finalizar su fase de crecimiento (>1% de peso seco) (Czygan, 1968; Johnson & An, 1991; Sommer *et al.*, 1991,1992; Choubert & Heinrich, 1993; Cordero *et al.*, 1996).

La utilización de las esporas rupturadas de la microalga *Haematococcus pluvialis* como fuente pigmentante en truchas arcoiris fue reportada por Sommer *et al.*, (1991), obteniendo una pigmentación inferior a la requerida comercialmente, debido al elevado porcentaje de esterificación de la astaxantina presente y a una incompleta ruptura de las esporas de la microalga. Los carotenoides analizados de esta alga han mostrado que la astaxantina es 3S, 3'S (Renstrom *et al.*, 1981) y están presentes primariamente como esteres de varios ácidos grasos (Renstrom & Liaaen-Jensen, 1981).

Otra microalga utilizada para la pigmentación de salmónidos es *Chlorella vulgaris*, al respecto, Gouveia *et al.*, (1996a,b, 1998) reportaron mayor retención de carotenoides en el músculo que otras microalgas tales como *Spirulina* (Choubert, 1979) y *Haematococcus pluvialis* (Choubert & Heinrich 1993), pero menos eficiente que la lograda con astaxantina sintética y una coloración muscular similar a la obtenida utilizando pigmentos sintéticos.

También se ha informado que los géneros *Chlamidomonas*, *Chlorococcum*, *Neochloris* y *Protosiphon* contienen importantes cantidades de carotenoides (hasta 25.000 ppm de

astaxantina, principalmente monoésteres) (Markovits, 1991; Priksen & Iversen, 1994; Saoudi-Helis *et al.*, 1994).

Markovits (1991) señaló que a pesar de que las microalgas son la fuente natural, con el más alto contenido de astaxantina conocido, el interés para la explotación comercial de estos organismos no ha sido suficiente debido a un menor desarrollo de las tecnologías de su cultivo, en comparación con organismos heterotróficos como las levaduras.

### ***Plantas superiores***

La utilización de vegetales como fuente de pigmentación para trucha arcoiris, se caracteriza porque al incorporarlos en el alimento se añaden pigmentos que con excepción del género *Adonis*, no contienen astaxantina (la cual proporciona la coloración natural rosada al músculo y piel). Los pigmentos de origen vegetal al ser depositados en el músculo de los salmónidos proporcionan una coloración diferente o menos deseable que la astaxantina. Al respecto, Peterson *et al.* (1966) reportaron que la inclusión de un extracto rico en xantofilas (paprika) en el alimento de trucha café, resultó en la deposición en piel y músculo proporcionando una coloración amarilla indeseable. Al alimentar a la trucha con pétalos de marigold (luteína) también se reporta una rápida deposición del pigmento en piel y músculo pero proporciona una coloración amarilla. Los efectos de la luteína fueron confirmados por Lee *et al.* (1978).

Torrissen *et al.* (1989) reportaron la utilización de trucha arcoiris de las plantas *Hyppophae rhamnoides* (luteína, zeaxantina, violaxantina, pero principalmente  $\beta$ -carotenos), *Tagetes erecta* (principalmente luteína) y *Cucurbita marcia* (zeaxantina y luteína), sin embargo, estos investigadores concluyen que estas plantas tendrían sólo un pequeño potencial de utilización como insumos pigmentantes, en dietas balanceadas de uso comercial. Morimoto *et al.*, 1989; demostró el efecto de la acumulación de pigmentos de paprika en *Cyprinus carpio*.

Por otro lado, no todos los vegetales tendrían bajas perspectivas de utilización. Hannasch & Néelson (1990) al utilizar el extracto saponificado del pimentón rojo o paprika (principalmente capsantina y capsorrubina) como fuentes de pigmentación para trucha arcoiris y Salmón del Atlántico, demostraron que este extracto tiene el potencial de reemplazar un 50% de la astaxantina utilizada en la formulación de dietas prácticas. Por lo tanto concluyeron, que el extracto de paprika se perfila como una buena fuente complementaria para la salmonicultura comercial. Al respecto Vernon *et al.* (1994), Yanar *et al.* (1997) & Akhtar *et al.* (1999) reportan menor eficiencia en la pigmentación de trucha arco iris al utilizar red pepper (paprika) que los pigmentos comercialmente disponibles.

Otra fuente pigmentante con buenas expectativas de utilización son las flores de las plantas del género *Adonis*, que es el único género del reino vegetal que ha sido reportado como fuente de ésteres de astaxantina (Markovits, 1991).

Kamata, 1985; Kamata *et al.*, 1990, por su parte estudiaron la utilización de extractos y pétalos de *Adonis aestivalis* como fuente de pigmento para trucha arcoiris. Los extractos de Adonis confirieron un color rosado brillante a la carne de las truchas que lo consumieron, en cambio en el grupo de peces alimentado con pétalos enteros se encontró una mortandad del 36% de la población, después del primer mes de ensayo, lo que fue interpretado como resultado de la presencia de glicósidos tóxicos en los pétalos.

En México se han evaluado la utilización de oleorresinas no saponificadas de Chile (*Capsicum annumm*), su aplicación ha mostrado su potencial para pigmentar salmonidos. No obstante, aún falta continuar con la evaluación de las fuentes mencionadas y realizar los bioensayos pertinentes. Además de los estudios económicos que demuestren su factibilidad.

## CONCLUSIONES

Es incuestionable que los pigmentos sintéticos comerciales han mostrado ser muy eficientes en cuanto a la coloración en los salmónidos, y que las investigaciones realizadas para conocer los factores que influyen sobre la pigmentación y los mecanismos involucrados en estos facilitan el entendimiento del proceso de pigmentación. También resulta evidente que los retos a enfrentar para ofrecer un producto, con precio competitivo, estable, con concentraciones adecuadas de carotenoides, y de fácil manejo difieren entre las diferentes fuentes de pigmentantes naturales. Así para el caso de la astaxantina extraída de desechos de crustáceos se requiere optimizar su proceso de extracción y abaratar sus costos.

En el caso de los pigmentos de origen vegetal, uno de los principales retos a enfrentar es la biodisponibilidad y el tono que se obtiene el músculo al asimilarlos, por lo que las investigaciones se están centrando en cambiar la estructura química de las moléculas para aumentar su biodisponibilidad.

Es necesario reducir costos en la producción de la levadura para ser competitiva con la astaxantina.

Con respecto a las algas si bien la producción de biomasa (cultivo) no es un obstáculo, si se requiere optimizar el proceso de extracción de pigmentos.

Existe evidencia que los carotenoides aparte de ofrecer una coloración adecuada, pueden proporcionar beneficios biológicos en el pez. El evaluar estas opciones justificaría el alto precio que se paga por su incorporación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Akhtar P., Gray., 1999. Dietary pigmentation and deposition of a-tocopherol and carotenoids in rainbow trout muscle and liver tissue. *J. Food Sci.* 64, 234-239.
- An, G-H., Schuman, D. B., Johnson, E. A., 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 116-121.
- Andre, E., 1926. Influence de l'alimentation sur la pigmentation cutanée des salmonides. *Revue Suisse de Zoologie.* 33,659-666.

- Andrewes, A.G., Phaff, H., Starr, M. P., 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry* 15, 1003-1007.
- Barbosa M. J., Morais R., Choubert G., 1999. Effect of carotenoid source and dietary lipid content on blood astaxanthin concentration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 176, 331-341.
- Binkowski, F.P., Sedmak, J. J., Jolly, S. O., 1993. An evaluation of *Phaffia* yeast as a pigment source for salmonids. *Aquaculture Magazine* March/April, 54-59.
- Bjerkeng, B., Storebakken, T., Llaen-Jensen, S., 1990. Response to carotenoids by rainbow trout in the sea: resorption and metabolism of dietary astaxanthin and canthaxanthin. *Aquaculture*. 91, 153-162.
- Bjerkeng, B., Folling, M., Lagocki, S., Storebakken, T., Olli, J. J., Alsted, N., 1997a. Bioavailability of all-E-astaxanthin and Z-astaxanthin isomers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 157. 63-82
- Bjerkeng, B., 2000. Carotenoid pigmentation of salmonid fishes-recent progress. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo. R., (Eds). Avances en Nutrición Acuicola V. *Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola* 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
- Bjerkeng, B., Hatlen B., Wathne E., 2000a. Corrigendum "Deposition of astaxanthin in fillets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with herring, capelin, sandeel, or Peruvian high PUFA oils". *Aquaculture*. 180, 307-319.
- Borowitzka, G. A., Huisman, J. M., Osborn, A., 1991. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*: I. Effects of nutrients on growth and cell type. *J. Appl. Phycol.* 3, 295-304.
- Boussiba, S., Fan, L., Vonshak, A., 1992. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. *Methods Enzymol.* 213, 386-391.
- Castro C., Mena G., 1994 .Control de calidad de insumos y dietas acuicolas. Pigmentos carotenoides-rol nutricional en especies salmonideas y fuentes de pigmentación Aquila II pp.213-227
- Choubert, G., Milicua, J.-C. G., Gomez R., Sance S., Petit, H., Negre-Sadargues, G., Castillo, R., Trilles, J.-P., 1995. Utilization of carotenoids from various sources by rainbow trout: muscle colour, carotenoid digestibility and retention. *Aquaculture International* 3, 205-216.
- Choubert, G., Heinrich, O., 1993. Carotenoids pigments of the green alga *Haematococcus pluvialis*: assay on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, pigmentation in comparison with synthetic astaxanthin and canthaxanthin. *Aquaculture* 112, 217-226.
- Choubert, G., Luquet, P., 1983. Utilization of shrimp meal for rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) pigmentation. Influence of fat content of the diet. *Aquaculture*. 32, 19-26.
- Choubert, G., 1979. Tentative utilization of spirulin algae as a source of carotenoid pigments for rainbow trout. *Aquaculture*. 18, 135-143.
- Cordero, B., Otero, A., Patiño, M., Arredondo, B.O., Fabregas, J., 1996. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions, *Biotechnol. Lett.* 18, 213-218.
- Czygan, F.-C., 1968. Secondary carotenoids in green algae: II. Studies on biogenesis. *Arch. Mikrobiol.* 62, 201-236.
- Fan, L., Vonshak, A., Boussiba, S., 1994. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 30, 829-833.
- Goodwin, T.W. Jamirkon, M., 1954. Studies in carotenogenesis: II. Carotenoid synthesis in the alga *Haematococcus pluvialis*. *Biochem. J.* 57, 376-381.
- Gormley, T. R., 1992. A note on consumer preference of smoked colour. *Irish J. Agric. Food Res* 31, 199-202.
- Gouveia, L. Gomes, E., Empis, J., 1996a. Potential use of microalgae (*Chlorella vulgaris*) in the pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung* 202, 75-79.
- Gouveia, L. Gomes, E., Empis, J., 1996b. Use of *Chlorella vulgaris* in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*), diets to enhance muscle pigmentation. *Journal of Applied Aquaculture* 7, 61-70.
- Grung, M., Liaen-Jensen, S., 1993. Algal carotenoids 52<sup>o</sup>; Secondary carotenoids in a natural bloom of *Euglena sanguinea*. *Biochemical Systematics and Ecology* 21(8): 757-763-
- Grung, M., D'Souza, F.L., Borowitzka, M., Jensen, L.S., 1992. Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S) astaxanthin esters. *Journal of Applied Phycology* 4, 165-171.

- Haard, N.F., 1988. Astaxanthin formation by the red yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. *Biotechnology Letters*. 10, 609-614.
- Hannasch, K., Nelson, C., 1990. Efficacy of liquid Kem glo MR bran in the pigmentation of commercial Atlantic salmon: Field trial in the Bay of Fundy. Pigmenter Research. *Bulletin of Kemin Industries Inc.*
- Hata, M., Hata, M., 1973. Studies on astaxanthin formation in some fresh-water fishes. *Tohoku J. Agric. Res.* 24, 192-196.
- Hatano, M., Takahashi, K., Takama, S., Nakajima, S., 1987. Sensory evaluation of the flesh quality of fall chum salmon. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ* 38, 311-321.
- Johnson, E. A., Conklin, D. E., Lewis, M. J., 1977. The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. *J.Fish Res Board Can.* 34:2417-2421.
- Johnson, E. A., Villa, T. G., Lewis, M. J., 1980. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. *Aquaculture* 20, 123-134.
- Johnson, E. A., An, G.-H., 1991. Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotechnol* 11(4), 297-326.
- Kamata, T., Neamtu, G. Tanaka, Y., Sameshima, M., Simpson, K. L., 1990. Utilization of *Adonis aestivalis* as a dietary pigment source for rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Nippon Suisan-Gakkaishi Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 56 (5), 783-788.
- Kamata, T., 1985. Study of astaxanthin diester in the flower *Adonis aestivalis* and its application for the pigmentation of rainbow trout. *Tesis para el grado de Ph.D.*, University of Rhode Island.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S., 1991. Astaxanthin production by a green alga *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *J. Ferment. Bioeng.* 71, 335-339.
- Lambertsen, G., Braekkan, O. R., 1971. Method of analysis of astaxanthin and its occurrence in some marine products. *J.Sci. food Agric.* 22, 99-101.
- Lorenz, R. T. Cysewski, G. R., 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18, 160-167.
- Markovits, A., 1991. *Adonis*: Potencial fuente vegetal de astaxantina. *Chile pesquero* 69, 25-26.
- Meyers, S. P., 1994. Developments in world aquaculture, feed formulation, and role of carotenoids. *Pure appl. Chem.* 66,1069-1076.
- Meyers S. P., Chen, H. M., No, H. K., Lee, K. S., 1990. An integrated approach to recovery and utilization of Louisiana crawfish processing wastes. *Proc of the International By-Products Conference*, April 1990, Anchorage, Alaska.
- Meyers, S. P., Bligh, D., 1981. Characterization of astaxanthin pigments from heat-processed crawfish waste. *J. Agric. Food Chem.* 29, 505-508.
- Miller, M. W., Yaneyama, M., Soneda, M., 1976. *Phaffia* a new yeast genus in the *Deuteromycotyna* (Blastomycetes). *Int. J. Syst. Bacterial* 26, 286.
- Morimoto, T., Amato, T., Okamoto, M., 1989. The accumulation of pigments from paprika and other sources in the integument of fancy red carp *Cyprinus carpio*. *Third International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish*. Toba, Japan. August 28-September 1.
- Ostrander, J., Martinsen, C., Liston, J., McCullough, J., 1976. Sensory testing of pen-reared salmon and trout. *J. Food Sci.* 41, 386-390.
- Priksen, N. T., Iversen J. J. L., 1994. Photosynthetic pigments as nitrogen stores in *Rhodomonas sp.* 3rd. International Marine Biotechnology conference, Tromsøe-University. Tromsøe-Norway, Abstract, p.116
- Renstrom, B., Borch, G., Skulberg, O. M., Liaaen-Jensen, S., 1981. Optical purity of (3S, 3'S)-astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Phytochemistry* 20(11), 2561-2564.
- Renstrom, B., Liaaen-Jensen, S., 1981. Fatty acid composition of some esterified carotenoids. *Comp. Biochem. Physiol.* 69B, 626-627.
- Round, R. C., Glenn, C. L., Bush, A. O., 1992. Consumer acceptance of brown trout (*Salmo trutta*) as an alternative species to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Food Science.* 57, 572-574.
- Saito, A., Reiger, L. W., 1971. Pigmentation of brook trout by feeding dried crustacean wastes. *J. Fish Res. Can.* 28, 509-512.
- Spinelli, A. L., Haard, N. F., 1991. Pigmentation of rainbow trout with enzyme-treated and spray dried *Phaffia rhodozyma*. *The Progressive Fish-Culturist* 53,1-6.

- Sigurgisladottir, S., Parrish, C. C., Lall, S. P., Ackman, R. G., 1994. Effects of feeding natural tocopherols and astaxanthin on Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillet quality. *Food Res. Int.* 27, 23-32.
- Skonberg, D. I., Hardy, R. W., Barrows, F. T., Dong F. M., 1998. Color and flavor analyses of fillets from farm-raised rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low-phosphorus feeds containing corn or wheat gluten. *Aquaculture*. 166, 269-277.
- Sommer, T. R., D'Sousa, F., Morrissy, N., 1992. Pigmentation of adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Aquaculture* 106, 63-74.
- Sommer, T. R., Potts, W. T., Morrissy, N. M., 1991. Utilization of microalgal astaxanthin by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 94, 79-88
- Spinelli, J., Lehman, L., Wieg, D., 1974. Composition, processing, and utilization of red crab (*Pleuroncodes planipes*) as an aquacultural feed ingredient. *J Fish. Res. Board Can.* 31, 1025-1029.
- Storebakken, T., No, H. K., 1992. Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture*. 100, 209-229.
- Sylvia, G., Morrissey, M. T., Graham, T., García, S., 1996. Changing trends in seafood markets: the case of farmed and wild salmon. *J. Food Prod. Market.* 3, 49-63.
- Sylvia, G., Morrissey, M. T., Graham, T., García, S., 1995. Organoleptic qualities of farmed and wild salmon. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 4, 51-64.
- Tangerás, A., Slinde, E., 1994. Coloring of salmonids in aquaculture the yeast *Phaffia rhodozyma* as a source of astaxanthin. (ed by Martin, A.M.) pp.148-168. *Fisheries Processing: Biotechnological Applications*. Chapman and Hall, London.
- Torrissen, O. J., 1985. Strategies for salmonid pigmentation. *Journal of Applied Ichthyology*. 11, 276-281.
- Torrissen, O. J., Hardy, R. W., Shearer, K. D., 1989. Pigmentation of salmonids-carotenoid deposition and metabolism. *Reviews in Aquatic Sciences*. 1, 209-225.
- Vernon-C. J., Ponce-P. J., Pedroza-I. R., 1994. Bioensayo de pigmentación de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) con extractos de chile ancho (*Capsicum annuum*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 44 (4), 252-255.
- Yanar, M., Kumlu, M., Celik, Y., Yanar, Y., Tekelioglu N., 1997. Pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with carotenoids from red pepper. *The Israeli Journal of Aquaculture-Badmidgeh*. 49(4), 193-198.
- Yong, Y. Y. R., Lee, Y. K., 1991. A possible role of photoprotection for secondary carotenoids in the cytoplasm of the green alga *Haematococcus lacustris* (Chl. Rophyta). *Phycologia*. 30, 257-261.
- Young, A., Britton, G., 1998. *Carotenoid in photosynthesis*. 1st.ed. pp. 498. Chapman and Hall. London.