

반응표면분석법을 이용한 *Paracoccus* sp.의 Astaxanthin 생산배지 최적화

최종일¹ · 이희섭¹ · 최선강² · 김재훈¹ · 김진규¹ · Norihiko Misawa³ · 변명우¹ · 이주운^{1*}

¹한국원자력연구원 방사선과학연구소, ²강릉과학산업진흥원, ³Kirin Holdings Co., Ltd.

Optimization of Medium for Astaxanthin Production by *Paracoccus* sp. Using Response Surface Methodology

Jong-il Choi¹, Hee-Sub Lee¹, Seon-Kang Choi², Jae-Hun Kim¹, Jin Kyu Kim¹,
Norihiko Misawa³, Myung-Woo Byun¹, and Ju-Woon Lee^{1*}

¹Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute,

²Gangneung Science Industry Bio Foundation, Republic of Korea. ³Kirin Holdings Co., Ltd., Japan.

Abstract This study was to optimize the medium components for astaxanthin production in *Paracoccus* sp. through surface response methodology. A screening test was first conducted on 5 medium components using a Plackett-Burman design, from which MgSO₄ and yeast extract were identified as the significant factors affecting astaxanthin production. These significant factors were optimized by central composite design of experiments and response surface methodology, as 2.83 g/L MgSO₄ and 7.02 g/L yeast extract, respectively. The expected astaxanthin concentration with these optimized medium compositions were 0.925 mg/L. In flask culture, the experimentally obtained concentration of astaxanthin was 1.021 mg/L, where it had been 0.4 mg/L before optimization.

Keywords: Response surface method, astaxanthin, *Paracoccus* sp.

서 론

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione)은 carotenoid 계열의 항산화 물질로서, 주로 새우, 붉은 도미류, 연어 및 바닷가재 등과 같은 해양 동물의 조직에 존재하는 것으로 알려져 있다(1, 2). Astaxanthin은 정상적인 호기적 대사과정 중 활성산소에 의한 세포벽 내 DNA, 단백질, 지질 등의 손상과 세포와 조직의 노화 및 발암을 유발하는 반응을 억제할 뿐만 아니라, 유리 라디칼의 생성을 억제하는 작용을 한다. Astaxanthin은 다른 carotenoid 보다 최소한 10배, α -tocopherol 보다 500배 이상의 항산화 활성을 가지고 있는

데 이는 C-4와 C-4'에 위치한 oxo- 그룹 때문이라고 보고되어 있다. 특히 다른 많은 고등동물에서는 생합성 되지 않는 특성으로 인해 양계를 포함한 가금 산업이나, 연어, 송어 등을 포함한 양식 산업에 있어서 색소, 풍미원 및 항산화 활성으로 인해 중요한 첨가제 역할을 하고 있다(3). 또한 인체 내에서 vitamin A의 전구체 역할을 하며, cytokine 유도 활성으로 인한 면역기능 활성화, oxygen radical의 제거에 의한 난소암, 간암 등의 예방효과 등이 입증되어 의료 및 화장품 산업에도 상당한 가치가 인정되고 있어 최근 많은 관심을 받고 있는 물질이다(4).

최근에 astaxanthin의 화학 합성법이 개발되었으나, 화학 합성으로 제조된 astaxanthin은 천연물에 비해 낮은 생체 흡수율을 보임에 따라, 천연 astaxanthin의 생산에 상업적 관심이 일고 있다.

현재 astaxanthin을 생성하는 균주로는 효모인 *Phaffia*

*Corresponding author

Tel: +82-63-570-3204, Fax: +82-63-570-3207

e-mail: sjwlee@kaeri.re.kr

rhodozyma(5), 녹색조류인 *Haematococcus pluvialis*(6), gram-positive 박테리아인 *Brevundimonas* sp.(7), 그리고 gram-negative인 *Paracoccus* sp.(8, 9) 등이 알려져 있다. 이 중에서 *Paracoccus* sp.는 gram 음성균의 해양미생물로서, 최근 astaxanthin 생합성 유전자가 분리되어졌다. *Paracoccus* 를 이용한 astaxanthin의 생산은 연어 등의 양식이나 양계 사업에서 생산 균주의 파쇄 및 astaxanthin의 추출과정 없이 균체를 바로 섭취 시킬 수 있고, 조류나 곰팡이에 비해 배양하기 용이하다는 등의 장점을 가지고 있다. 하지만, 아직까지 *Paracoccus*를 이용한 astaxanthin의 생산성이 낮다는 단점이 있다. 따라서 본 논문에서는 astaxanthin의 생산성 향상을 위한 *Paracoccus* 배양의 최적화를 수행하였다.

반응표면분석은 전형적인 최적화 방법으로 일반적으로 여러 변수를 사용하여 최적 조건을 찾는 system(10)으로 하나의 변수와 다른 변수들과의 상호작용으로 인한 효과를 측정하여 변수들의 최적값을 확인할 수 있는 분석법이다. 따라서 본 연구는 *Paracoccus*를 이용한 astaxanthin 생산의 산업적 이용 가능성을 알아보기 위해 반응표면분석을 사용하여 astaxanthin의 최대 생산성을 보여주는 배지의 조성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주

본 연구에서 astaxanthin 생산 미생물은 *Paracoccus* sp. N81106 (MBIC 01143, Marine Biotechnology Institute Culture Collection, Iwate, Japan)을 사용하였다. 이 균주는 Marine Broth (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) 배지에 접종하여 30% glycerol에 현탁하여 -70°C에 보관하여 사용하였으며, Marine Agar (Difco) 배지를 이용하여 25°C에서 계대 배양하였다.

배양 배지 및 배양 조건

전배양 한천 배지는 Marine Agar 배지 (Difco)에 접종하여 25°C에서 48시간 배양하여 사용하였다. 액체 배양은 Marine Broth 배지를 25 mL씩 250 mL baffled flask에 넣고 멸균한 후 균주를 접종하여 25°C에서 150 rpm으로 교반하여 3일간 배양하였다.

통계적 실험 설계를 위한 배지 조성은 Blaszczyk의 배지를 참고(11)하여 K_2HPO_4 (Junsei, Tokyo, Japan) 7.0 g/L, KH_2PO_4 (Yakuri, Osaka, Japan) 3.0 g/L, sodium citrate·2H₂O (Sigma, St. Louis, MO) 0.5 g/L, KNO_3 (Yakuri) 1.8 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (DO Chemical co, Seoul, Republic of Korea) 0.5 g/L, tryptone (Difco) 0.25 g/L, yeast extract (Difco) 1 g/L, NaCl (DO Chemical Co) 2 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ (DO Chemical Co) 1 g/L의 조성을 사용하였다.

실험 설계는 Plackett-Burman의 방법(12)을 이용하여 설계하였으며, 각각 25 mL씩 250 mL baffled flask에 넣고 멸균한 후 균주를 접종하여 25°C에서 150 rpm으로 교반하여 3일간 배양하여 사용하였다.

모든 실험균은 3회 반복하여 진행하였다.

반응표면분석 (response surface methodology ; RSM)의 실험 설계

Astaxanthin의 최대 생산성을 보여주는 배지 조성을 최적화하기 위해 반응표면분석법 (RSM)(13, 14)을 이용하였다. 배지조성에 대한 실험계획은 중심합성계획 (Central composite design; CCD)(15)을 사용하였다. 중심점 (Center Point; CP)을 잡기위해 steepest ascent experiment (SAE)를 하였으며, SAE 결과 최대값을 얻었을 때의 변수를 중심점으로 하여 CCD 실험설계를 하였다. 12개의 실험군은 각각 3반복 하여 실험하였으며 이에 따른 모델식은 다음과 같다(식 1).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (1)$$

중속 변수 Y는 astaxanthin의 생산량이고 astaxanthin 생산에 중요한 독립 변수는 X_1 과 X_2 이다.

Astaxanthin 분석

Astaxanthin 생산량의 측정은 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 이용하였다. 배양액을 원심분리기 (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, German)를 사용하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, methanol : dichloromethane (3 : 1)용액을 1 mL 첨가하여 20분간 sonication 하여 세포벽을 파쇄하여 색소가 용매에 추출되도록 한 다음 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 불순물이 제거된 용매층을 취하였다.

HPLC는 Agilent사 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)의 1200 series를 이용하였다. Column은 Thermo® C-18, 250 × 4.6 mm, particle size; 5 μm column (Thermo electron cooperation, USA)을 사용하였고 column 온도는 30°C로 하였다. 이동상으로는 dichloromethane, methanol, acetonitrile, water를 비율을 달리하여 용매 A (5 : 85 : 5.5 : 4.5, v/v)와 용매 B (22 : 28 : 45.5 : 4.5, v/v)로 하였다. 각각의 용매는 5분까지 용매 A를 100%로 하였고, 8분까지 용매 B를 100%로 점차적으로 올렸다. 그 후 5분 동안 용매 B의 비율을 100%로 유지한 다음 2분 동안 시작 할 때의 용매 비율과 같게 하였다. 유속은 1 mL/min이었으며, DAD detector로 480 nm에서 분석하였다. 표준곡선은 astaxanthin (Sigma)을 이용하여 검량곡선을 작성한 후 함량 계산에 활용하였다.

성장률 측정

*Paracoccus*의 성장률을 분광광도계 (UV 1600 PC, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양액을 100 µL 취하여 멸균된 0.9% saline solution 900 µL에 넣어 10배 희석하여 흡광도를 측정하였고, 멸균된 saline solution을 blank로 사용하여 혼탁도를 측정하였다.

통계 분석

반응표면분석을 위하여 SAS (Statistical Analysis System, SAS International Inc., Cary, NC)를 이용하였다(16). 실험 결과를 분산분석, 모수추정, 능선분석과 정준분석 등을 이용하여 독립 변수에 대한 종속변수를 등고선 또는 삼차원 표면도로 나타내어 함수관계를 추정하고, 예측하여 최적화 하였다.

결과 및 고찰

Marine Broth 및 modified Blaszczyk 배지에서의 astaxanthin 생산량

Paracoccus sp.의 Marine Broth와 modified Blaszczyk 배지에서의 astaxanthin 생산량을 알아보았다.

Table 1. The amount of astaxanthin produced by *Paracoccus* sp. in Marine Broth and modified Blaszczyk medium

medium	Astaxanthin conc. (mg/L)	OD	Astaxanthin content (mg/L/OD)
Marine Broth	0.39 ± 0.03	2.37 ± 0.02	0.16 ± 0.05
Modified Blaszczyk medium	0.40 ± 0.01	1.49 ± 0.02	0.26 ± 0.04

Table 1와 같이 Marine Broth에서의 astaxanthin 농도는 0.39 mg/L의 값을 가졌다. Modified Blaszczyk 배지를 이

Table 2. Plackett-Burman experimental design matrix for screening of important variables for astaxanthin production

Code levels					Real variables					Response value
X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₁ MgSO ₄ (g/L)	X ₂ tryptone (g/L)	X ₃ Yeast extract (g/L)	X ₄ NaCl (g/L)	X ₅ (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Y astaxanthin (mg/L)
-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0.5	1	0.5	0.26 ± 0.00
-1	-1	-1	-1	1	0	0	0.5	1	1.5	0.28 ± 0.01
-1	-1	-1	1	-1	0	0	0.5	3	0.5	0.29 ± 0.00
-1	-1	-1	1	1	0	0	0.5	3	1.5	0.29 ± 0.00
-1	-1	1	-1	-1	0	0	1.5	1	0.5	0.33 ± 0.01
-1	-1	1	-1	1	0	0	1.5	1	1.5	0.31 ± 0.00
-1	-1	1	1	-1	0	0	1.5	3	0.5	0.39 ± 0.02
-1	-1	1	1	1	0	0	1.5	3	1.5	0.41 ± 0.02
-1	1	-1	-1	-1	0	0.5	0.5	1	0.5	0.31 ± 0.00
-1	1	-1	-1	1	0	0.5	0.5	1	1.5	0.31 ± 0.01
-1	1	-1	1	-1	0	0.5	0.5	3	0.5	0.33 ± 0.01
-1	1	-1	1	1	0	0.5	0.5	3	1.5	0.33 ± 0.01
-1	1	1	-1	-1	0	0.5	1.5	1	0.5	0.56 ± 0.05
-1	1	1	-1	1	0	0.5	1.5	1	1.5	0.56 ± 0.01
-1	1	1	1	-1	0	0.5	1.5	3	0.5	0.63 ± 0.02
-1	1	1	1	1	0	0.5	1.5	3	1.5	0.66 ± 0.03
1	-1	-1	-1	-1	1	0	0.5	1	0.5	0.51 ± 0.07
1	-1	-1	-1	1	1	0	0.5	1	1.5	0.46 ± 0.03
1	-1	-1	1	-1	1	0	0.5	3	0.5	0.46 ± 0.02
1	-1	-1	1	1	1	0	0.5	3	1.5	0.47 ± 0.02
1	-1	1	-1	-1	1	0	1.5	1	0.5	0.45 ± 0.04
1	-1	1	1	-1	1	0	1.5	3	0.5	0.50 ± 0.01
1	-1	1	1	1	1	0	1.5	3	1.5	0.46 ± 0.01
1	1	-1	-1	-1	1	0.5	0.5	1	0.5	0.50 ± 0.02
1	1	-1	-1	1	1	0.5	0.5	1	1.5	0.51 ± 0.01
1	1	-1	1	-1	1	0.5	0.5	3	0.5	0.50 ± 0.02
1	1	-1	1	1	1	0.5	0.5	3	1.5	0.52 ± 0.02
1	1	1	-1	-1	1	0.5	1.5	1	0.5	0.52 ± 0.04
1	1	1	-1	1	1	0.5	1.5	1	1.5	0.50 ± 0.04
1	1	1	1	-1	1	0.5	1.5	3	0.5	0.39 ± 0.01
1	1	1	1	1	1	0.5	1.5	3	1.5	0.40 ± 0.01
0	0	0	0	0	0.5	0.25	1	2	1	0.40 ± 0.01

용한 배양에서도 0.40 mg/L astaxanthin 농도를 보였다. 하지만, Marine Broth에 비하여 Modified Blaszczyk 배지에서는 낮은 세포 농도로 인하여 높은 astaxanthin 함량을 가졌다. Astaxanthin은 세포내 존재하기 때문에 astaxanthin의 높은 함량은 추출 공정 뿐만 아니라, 사료 첨가제로 사용할 경우 미생물 양을 줄일 수 있다는 장점이 있다.

이러한 modified Blaszczyk 배지를 최적화하기 위하여 반응표면분석법을 이용하여 실험설계 하였다.

통계적 실험설계를 이용한 중요 요소 결정

반응표면분석은 발효공정의 최적화를 수행하는데 가장 효과적인 것으로 알려져 있다. 분류 변수 설계를 위한 각 변수의 범위와 그 결과를 Plackett-Burman의 실험설계를 이용하여 Table 2에 제시하였다. 무기염이 carotenoids 생성을 증가시킨다는 보고(17)에 따라 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$ 과 질소원인 tryptone, yeast extract, 그리고 NaCl을 각각의 독립변수로 두어 astaxanthin 농도를 측정하여 astaxanthin 농도에 영향을 주는 인자를 확인하였다.

측정 결과 astaxanthin을 가장 많이 생합성한 배지 조건은 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 가 첨가되지 않고, tryptone 0.5 g/L, yeast extract 1.5 g/L, NaCl 3 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1.5 g/L가 첨가되었을 때였고 astaxanthin 생산량은 0.66 mg/L의 생산성을 보였다. 가장 적게 생합성한 배지는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 와 tryptone이 첨가되지 않은 yeast extract 0.5 g/L, NaCl 1 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g/L의 조성을 가질 경우였으며, 이 때 astaxanthin 생산량은 0.26 mg/L을 보였다.

이 실험 결과들을 가지고 회귀분석을 통한 중요 변수를 확인한 결과 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, yeast extract, tryptone, NaCl, $(NH_4)_2SO_4$ 의 순으로 t-값이 높게 계산되었으며, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 와 yeast extract가 astaxanthin 생성의 주요 변수로 확인 되었다. 이에 따라 K_2HPO_4 (7.0 g/L), KH_2PO_4 (3.0 g/L), sodium citrate $\cdot 2H_2O$ (0.5 g/L), KNO_3 (1.8 g/L), tryptone (0.25 g/L), NaCl (2 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (1.0 g/L)을 고정시키고 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 와 yeast extract의 농도에 변화를 주어 steepest ascent experiment (SAE)를 측정하였다.

Table 3. Design and results of the steepest ascent experiment

Step change value	Code levels		Real variables		Response value
	X_1	X_3	X_1^b MgSO ₄ (g/L)	X_3^c yeast extract (g/L)	Y astaxanthin (mg/L)
Center point	0	0	0	0	0 ± 0
△	1	1	0.5	1	0.32 ± 0.01
Center point + △	1	1	0.5	1	0.38 ± 0.01
Center point + 2△	2	2	1	2	0.38 ± 0.01
Center point + 3△	3	3	1.5	3	0.46 ± 0.05
Center point + 4△	4	4	2	4	0.55 ± 0.01
Center point + 5△	5	5	2.5	5	0.60 ± 0.01

$$X_1^b : X_1=0+\chi_1 \times 0.5.$$

$$X_3^c : X_3=0+\chi_3 \times 1.$$

Steepest ascent experiment (SAE) 및 반응표면 분석 (response surface methodology ; RSM)을 이용한 배지 최적화

SAE를 위한 배지 조성 및 결과를 Table 3에 제시하였다. $X_1 = 2.5$ g/L, $X_3 = 5$ g/L 즉, $MgSO_4$ 의 농도가 2.5 g/L, yeast extract의 농도가 5 g/L일때 가장 많은 astaxanthin (0.60 mg/L)을 생산하였다. 이때의 변수값을 중심점으로 하여 CCD 실험설계로 $MgSO_4$ 와 yeast extract의 농도를 설명변수로 하고, 실험으로 얻은 astaxanthin의 생산량을 반응변수로 하여 Table 4와 같이 반응표면분석을 실시한 결과 다음과 같은 모델식을 얻었다(식 2).

$$Y = 0.5944 - 0.0060 \times X_1 + 0.0360 \times X_3 - 0.0066 \times X_1^2 + 0.0089 \times X_1 \times X_3 - 0.00058 \times X_3^2 \quad (2)$$

Table 4. The experimental design and results of the CCD

Code levels		Real variables		Response value
X_1	X_3	X_1^b MgSO ₄ (g/L)	X_3^c Yeast extract (g/L)	Y astaxanthin (mg/L)
-1	-1	1	3.5	0.721
1	-1	4	3.5	0.672
-1	1	1	6.5	0.858
1	1	4	6.5	0.889
0	0	2.5	5	0.840
0	0	2.5	5	0.802
-1.414	0	0.397	5	0.767
1.414	0	4.621	5	0.852
0	-1.414	2.5	2.879	0.734
0	1.414	2.5	7.121	0.924
0	0	2.5	5	0.809
0	0	2.5	5	0.789

$$X_1^b : X_1=2.5+\chi_1 \times 1.5.$$

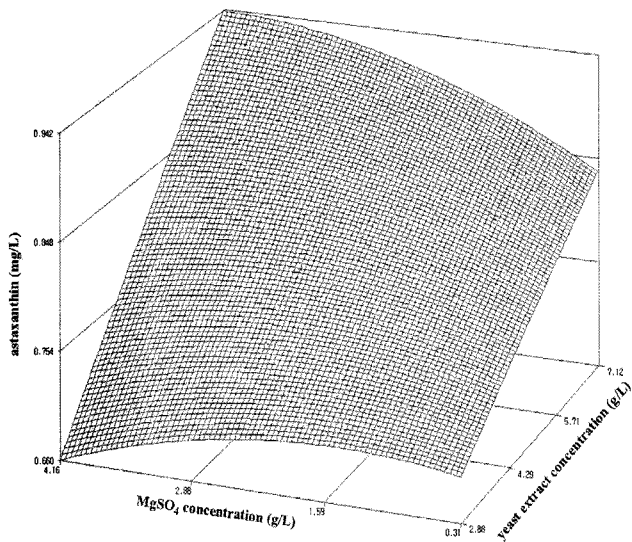
$$X_3^c : X_3=5+\chi_3 \times 1.5.$$

Y는 astaxanthin의 농도를 예상해주며, X_1 , X_3 는 $MgSO_4$ 와 yeast extract 농도가 coding된 값을 나타낸다. 분석결과 결정계수 (R^2)는 0.894로 계산되었다. 이는 실험설계 한 astaxanthin 생산성 설계와 89.4%의 적합성을 보였음을 의미한다. R^2 값은 항상 0과 1사이 존재하며, R^2 값 > 0.75일 때 바람직한 실험설계를 하였다고 할 수 있다.

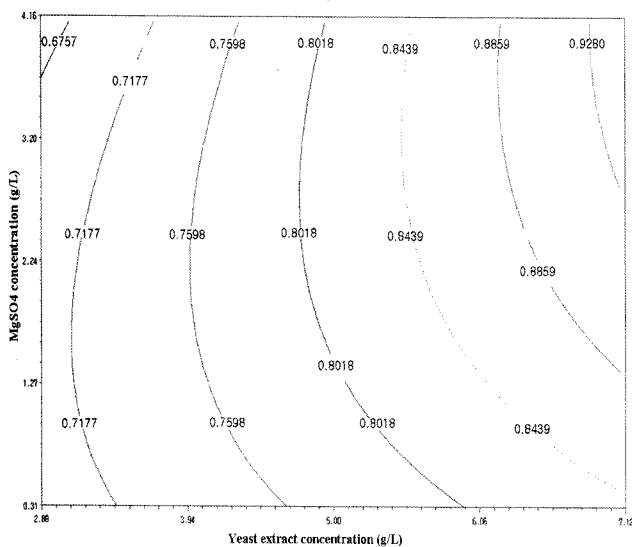
$MgSO_4$, yeast extract의 농도와 astaxanthin 생산량과의 관계를 파악하기 위해 Fig. 1과 같이 3차원 그래프 및 윤곽 그래프로 표현하였다. 그림에서와 같이 yeast extract의 농도가 증가할수록 astaxanthin의 생산량이 증가하였으며, yeast extract가 증가할수록 $MgSO_4$ 또한 증가하여야 astaxanthin의 생산성이 증가한다는 것을 알 수가 있었다. 즉, astaxanthin 생산에 가장 많은 영향을 주는 변수는 yeast extract이었으며, $MgSO_4$ 는 일정 농도에서 astaxanthin의 생산성을 증가시켜 주지만, 일정 농도 이상의 $MgSO_4$ 첨가 시 astaxanthin

의 생산량이 줄어드는 결과를 얻었다.

반응표면분석으로 예측된 정상점을 안장점으로 능선분석을 실시한 결과 astaxanthin의 최대 생산량은 0.925 mg/L 이었고 이때의 MgSO₄ 및 yeast extract의 농도는 각각 2.83과 7.02 g/L으로 나타났다. 이에 따른 확인 실험을 수행한 결과 1.021 mg/L의 astaxanthin을 생성하였다. 이러한 astaxanthin의 농도는 최적화되지 않은 modified Blaszczyk 배지에서 얻어진 농도의 250%의 증가를 보였다.



(a)



(b)

Fig. 1. (a) Three-dimensional response surface plot and (b) contour plot showing the interaction between MgSO₄ and yeast extract for the astaxanthin.

요약

Paracoccus sp.의 astaxanthin 생산성 증가를 위해 반응표면

분석법을 사용하여 최적의 배지조성을 설계하였다. *Paracoccus*의 성장 배지인 Marine Broth와 modified Blaszczyk 배지를 사용하여 astaxanthin 생산성을 측정된 결과 각각 0.39 mg/L, 0.40 mg/L의 astaxanthin 농도를 보였다. Modified Blaszczyk 배지의 조성을 각각 변수로 두어 가장 많은 영향을 주는 성분을 알아본 결과 MgSO₄와 yeast extract로 확인되었다. 중심합성계획법에 따라 MgSO₄ (0.397~4.621 g/L), yeast extract (2.879~7.121 g/L)를 달리하였을 때, astaxanthin 생산성에 대한 회귀식의 R²은 0.894로 나타났고, 이에 따른 최대 생산량은 0.925 mg/L로 예상되었으며 이때의 MgSO₄와 yeast extract의 농도는 각각 2.83과 7.02 g/L로 나타났다. 이에 대한 확인실험 결과 2.83 MgSO₄ g/L, 7.02 yeast extract g/L에서 1.021 mg/L의 astaxanthin이 생산되었으며, 배지의 최적화에 따라 250% 이상의 생산성 증가가 확인되어졌다.

감사의 글

본 연구과제는 한국원자력연구원 기본연구지원사업과 한국과학재단, 교육과학기술부의 원자력연구개발사업 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

접수 : 2008년 8월 27일, 게재승인 : 2009년 6월 17일

REFERENCES

- Higuera-Ciajara, I., L. Félix-Valenzuela, and F. M. Goycoolea (2006), Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications, *Cri. Rev. Food Sci. Nutr.* **46**, 185-196.
- Johnson, E. A. and G. H. An (1991), Astaxanthin from microbial sources, *Crit. Rev. Biotechnol.* **11**, 297-326.
- De Leenheer, A. P. and H. J. Nelis (1991), A review microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds, *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 181-191.
- Hussein, G., U. Sankawa, H. Goto, K. Matsumoto, H. Watanabe (2006), Astaxanthin, a Carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition, *J. Nat. Prod.* **69**, 443-449.
- Chumpolkulwong, N., T. Kakizono, S. Nagai, and N. Nishio (1997), Increased astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants isolated as resistant to diphenylamine, *J. Ferment. Bioeng.* **83**, 429-434.
- Suh, I. S., H.-N. Joo, C.-G. Lee (2006), A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation, *J. Biotechnol.* **125**, 540-546.
- Nishida, Y., K. Adachi, H. Kasai, Y. Shizuri, K. Shindo,

- A. Sawabe, S. Komemushi, W. Miki, N. Misawa (2005), Elucidation of a carotenoid biosynthesis gene cluster encoding a novel enzyme, 2,2'- β -hydroxylase, from *Brevundimonas* sp. strain SD212 and combinatorial biosynthesis of new or rare xanthophylls, *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4286-4296.
8. Tsubokura, A., H. Yoneda, and H. Mizuta (1999), *Paracoccus carotinigeniens* sp. nov., a new aerobic Gram-negative astaxanthin-producing bacterium, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 277-282.
 9. Lee, J. H., Y. S. Kim, T. J. Choi, W. J. Lee, and Y. T. Kim (2004), *Paracoccus haeundaensis* sp. nov., a Gram-negative, halophilic, astaxanthin-producing bacterium, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1699-1702.
 10. Box, E. P., and R. Draper (1987), Empirical model-building and response surface, New York: John Wiley & Sons.
 11. Blaszczyk, M. (1993), Effect of medium composition on the denitrification of nitrate by *Paracoccus denitrificans*, *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3951-3953.
 12. Plackett, R. L., and J. P. Bruman (1946), The design of optimum multifactorial experiments, *Biometrika* **33**, 305-325.
 13. Kim, Y. H., S. W. Kang, J. H. Lee, H. I. Chang, C. W. Yun, H. D. Paik, C. W. Kang, S. W. Kim (2006), Optimization of medium components for cell mass production of *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 using response surface methodology, *Korean. J. Biotechnol. Bioeng.* **21**, 479-483.
 14. Yoon, S. J., W. S. Shin, G. T. Chun, Y. S. Jeong (2007), Optimization of production medium by response surface method and development of fermentation condition for *Monascus pilosus* culture, *Korean. J. Biotechnol. Bioeng.* **22**, 288-296.
 15. Lee, G. D., J. E. Lee, J. H. Kwon (2000), Application of response surface methodology in food industry, *Food and Industry* **33**, 33-45.
 16. SAS Institute, Inc. (1990), SAS User's guide, Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC.
 17. Pringsheim, E. G. (1966) Nutritional requirements of *Haematococcus pluvialis* and related species, *J. Phycol.* **2**, 1-6.