

## 반응 표면 분석법을 사용한 새우껍질에서 astaxanthin 추출 조건의 최적화

윤창환 · 복희성 · 최대기\* · 노경호†

인하대학교 화학공학과  
402-751 인천광역시 남구 용현동 253  
\*한국과학기술연구원 연료전지센터  
136-791 서울 성북구 하월곡동 39-1  
(2011년 11월 17일 접수, 2012년 1월 6일 채택)

## Optimization Condition of Astaxanthin Extract from Shrimp Waste Using Response Surface Methodology

Chang Hwan Yoon, Hee Sung Bok, Dae Ki Choi\* and Kyung Ho Row†

Department of Chemical Engineering, Inha University, 253 Yonghyun-Dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea

\*Fuel Cell Research Center, Korea Institute of Science and Technology, 39-1 Hawolkok-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-791, Korea

(Received 17 November 2011; accepted 6 January 2012)

### 요 약

최적의 추출조건을 찾는데 매우 유용한 방법인 반응 표면 분석법(RSM, response surface methodology)을 사용하여 새우껍질로부터 astaxanthin 추출조건을 최적화하였다. 추출조건은 용매 에탄올과 추출물질의 비율, 추출온도(°C), 추출 시간(min)의 세가지 독립변수를 설정하여 BBD (Box-Behnken design) 방법을 이용하였다. 이 BBD 모델링은 0.9218의  $R^2_{adj}$  값과 0.0003의 확률 값 p 값으로 회귀 모델에 대한 신뢰도를 입증하였다. RSM 분석을 통해 찾아낸 새우껍질로부터 astaxanthin의 최적 추출조건은 에탄올 용매비 1:29.7, 추출온도 49.5 °C, 추출시간 59.9 분이고, 이 때 astaxanthin 추출량은 17.80 µg/g으로 예측하였다. 최적 수율로 예측된 결과는 각각의 조건에 따른 실험을 통해 그 예측의 정확도를 확인하였으며 17.77 µg/g으로 예측조건과 비슷한 결과를 보였다.

**Abstract** – A 17-run Box-Behnken design (BBD) was used to optimize the extraction conditions of astaxanthin from shrimp waste. Three factors such as ratio of ethanol to raw material, extraction temperature (°C) and extraction time (min) were investigated. The adjusted coefficient of determination ( $R^2_{adj}$ ) for the model was 0.9218, and the probability value ( $p=0.0003$ ) demonstrated a high significance for the regression model. The optimum extraction conditions were found to be: optimized ratio of ethanol to raw material 29.7, extraction temperature 49.5 °C and extraction time 59.9 min. Under these conditions, the mean extraction yield of astaxanthin was 17.80 µg/g, which was in good agreement with the predicted model value. Under these conditions, validation experiments were done and the mean extraction yield of astaxanthin was 17.77 µg/g, which is in good agreement with the predicted model value.

Key words: Astaxanthin, Shrimp Waste, Response Surface Methodology, Extraction

### 1. 서 론

베타카로틴( $\beta$ -carotene)과 매우 유사한 구조를 지니고 있는 astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta$ , $\beta'$ -carotene-4,4'-dione,  $C_{40}H_{52}O_4$ , FW 596.9)은 자연계에 널리 존재하는 케토-카로티노이드(keto-carotenoid)로써 polyisoprenoid와 oxygen quenching 기능을 가진 benzenoid ring의 결합 구조로 되어있다(Fig. 1). Astaxanthin은 주황색 또는 붉은색의 색소 물질로 갑각류 등 다른 해양생물과 조류에 존재하고, 비타민 E

인 알파-토코페롤( $\alpha$ -tocopherol)에 비하여 550 배에 해당하는 효과가 입증되어 있는 강력한 항산화 물질이다[1]. Astaxanthin의 강력한 항산화활성은 구조의 C-4, C-4'에 위치한 oxo-group 때문이라고 보고되어 있고[2], astaxanthin의 항산화 기작은 일중항 산소를 제거하거나[3] 자유라디칼 소거능[4], 과산화물 연쇄반응을 정지시키는 것으로 알려져 있다[5]. Astaxanthin의 항산화 작용은 일중항 산소의 제거에 의해 항암에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그 예로 astaxanthin의 활성산소 제거에 의한 개시와 진행의 과정을 감소시켜 난소암, 간암에 대한 예방효과 등이 보고된 바 있다[6,7]. 이 외에도 astaxanthin의 항암효과에 대한 많은 연구결과가 보고되었다[8,9]. 또한 astaxanthin은 면역기능에 활성이 있는 것으로 알려져 있고[10-

†To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: rowkho@inha.ac.kr

\*이 논문은 KAIST 홍원희 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

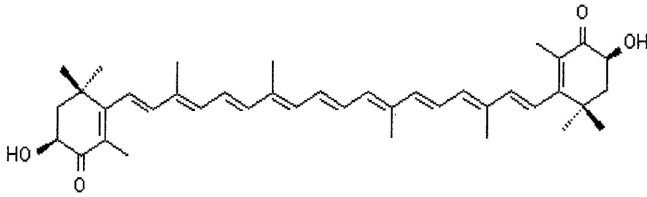


Fig. 1. The structures of astaxanthin.

12], 심장질환에 대한 치료효과도 보고되었다[13].

이 외에도 항염증 효과[14], 자외선 차단효과[15], 눈 기능과 관련된 효과[16,17], 간기능에 대한 영향 [18]이 보고된 바 있다. 현재까지의 연구결과들이 astaxanthin의 높은 생리활성을 입증하고 있고, 여러 천연자원에서 astaxanthin의 추출법 등의 연구가 활발히 이루어지고 있지만, astaxanthin은 이중결합을 가진 불포화화합물로 제조나 저장 시 열과 산화(빛)에 의해 쉽게 파괴되어 활성이 감소하여 응용범위에 한계가 있는 실정이다[19]. Astaxanthin의 천연공급원으로는 게, 새우 등의 갑각류나 효모, 해양생물 등이 있다. 갑각류(게, 새우)에서 추출된 astaxanthin은 추출이 용이한 장점은 있으나, 높은 회분과 키틴 함량으로 사용이 제한되고 있다. 효모인 파피아 로도지마(*Phaffia rhodozyma*)는 소량의 astaxanthin을 함유하고 생체이용률이 낮은 3R, 3'R form만을 생산하여 현재 동물의 사료로만 활용되고 있는 실정이다[20].

RSM (response surface methodology)은 최소의 실험횟수로부터 최대의 정보를 얻을 수 있는 실험계획법과 실험계획법에 의해 얻어진 실험 자료를 분석하여 복잡한 시스템의 성능을 이해하고 반응변수에 영향을 주는 유의한 요인효과들을 찾고 최적화하는데 사용된다[21]. 여러 개의 인자 중 하나씩 각각 변화시켜 실험을 진행하는 전통적인 실험법인 1회 1인자(one factor at a time) 실험법에 의해 최적의 실험 조건을 찾기 어렵고 복잡 공정에서 중요한 인자 간에 상호작용을 고려하지 못하고, 실험영역 전체를 균형 있게 판단하지 못하기 때문에 국지 최적점을 찾게 되는 문제점이 있다[22]. RSM은 전형적인 최적화 방법으로 일반적으로 여러 변수를 사용하여 최적 조건을 찾는 시스템으로 하나의 변수와 다른 변수들과의 상호작용으로 인한 효과를 측정하여 변수들의 최적 값을 확인할 수 있다.

본 연구에서는 RSM을 이용한 2차원 등고선 분석(contour plot)과 3차원 반응표면도 분석을 통하여 의약품, 화장품, 식품 등의 여러 가지 다양한 기능성이 입증되고 있는 astaxanthin을 추출하는 최적의 조건을 확립하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2-1. 실험재료 및 시약

본 연구에 사용된 새우껍질(shrimp waste)은 시장(Inchoen, Korea)에서 구하여 사용하였으며, 표준물질은 astaxanthin은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 또한 추출 시 사용된 물, 메탄올, 에탄올, 에틸아세테이트와 이동상에 사용한 물, 메탄올, 아세트나이트릴, 디클로로메탄은 J.T Baker (Phillipsburg, USA)의 HPLC grade를 사용하였고 실험에 사용된 모든 시료들은 HPLC에 주입하기 전에 필터(MFS-25, 0.45  $\mu$ m TF, Whatman, USA)를 이용하여 여과하였다.

### 2-2. 기기

본 연구에 사용한 분석용 HPLC 시스템은 JASCO (Tokyo, Japan) 기기로 검출기는 UV-2077 plus, 펌프는 PU-2089 plus, 컬럼오븐은 CO-2065 plus, 자동시료주입장치는 AS-2050 plus, 프로그램은 Chrompass chromatography data system (ver. 1.8.6.1, JASCO)을 사용되었으며, 사용된 컬럼으로는 Shiseido (Tokyo, Japan) 제품으로 C<sub>18</sub> (4.6×250 mm, 5  $\mu$ m) 컬럼을 사용하였다. 표준시료 및 검체시료 주입량은 20  $\mu$ L, 유속은 1.2 mL/min, 검출기 파장은 476 nm, 컬럼 오븐 온도는 40 °C, 이동상은 메탄올/아세트나이트릴/물/디클로로메탄 (85/5.5/4.5/5, v/v/v/v)로 하여 일정용매 조성법으로 실험하였다. 초음파 추출기기는 BRANSON(model 5510, 135W, USA) 사의 제품을 사용하였다.

### 2-3. 표준용액의 준비

실험에 사용된 표준용액은 표준시료 astaxanthin을 10 mg 측정하여 100 mL의 에탄올에 녹인 후 표준원액으로 제조하였다. 그 후 표준원액을 희석하여 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0  $\mu$ g/mL 농도로 표준액을 제조하여 검량선을 작성하고 이를 토대로 시험용액을 분석하였다.

### 2-4. Astaxanthin의 추출

새우껍질을 분쇄하여 고운 분말로 만들어 용매에 따른 astaxanthin의 추출수율을 측정하여 에탄올이 가장 적합하다는 것을 알아내어 추출 용매로 사용하였다. 그 후 추출온도 40 °C, 추출시간 60 분으로 조건을 고정시키고 에탄올 용매비 변화(1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50)에 따른 실험을 하고, 용매비 1:30, 추출시간 60 분으로 조건을 고정시키고 추출온도 변화(20, 30, 40, 50, 60 °C)에 따른 실험, 그리고 에탄올 용매의 비 1:30, 추출온도 40 °C로 조건을 고정시키고 추출시간 변화(5, 10, 20, 40, 60, 90 분)에 따른 astaxanthin의 추출 수율을 측정하였다.

### 2-5. 추출조건 설정을 위한 실험계획

본 실험에서는 추출조건을 최적화를 알기 위하여 RSM을 사용하였고, 추출조건에 대한 실험계획은 BBD를 실시하여 추출공정에 중요한 독립변수( $X_i$ )로 고려되는 인자 즉, 에탄올 용매비( $X_1$ ), 추출온도( $X_2$ ), 추출시간( $X_3$ )에 대한 실험범위를 설정하여 각각을 +1, 0, 1과 같이 3단계 부호화하였으며(Table 1), BBD에 따라 17개의 조건을 설정하여 추출실험을 하였다. Astaxanthin 추출에 있어서 추출조건이 미치는 영향을 예측된 모델식을 바탕으로 Design-Expert software (v.7.1.6, stat-Ease, Inc, Minneapolis, USA)를 사용하여 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3-1. 모델 구축 및 통계 분석

중량의 다섯 점을 포함하고 세가지 변수와 그의 세가지 레벨을 가

Table 1. Independent variables their levels used for BBD

Variables	Level		
	-1	0	1
Ratio of ethanol to raw material ( $X_1$ )	10	20	30
Temperature ( $X_2$ ) (°C)	30	40	50
Extraction Time ( $X_3$ ) (min)	20	40	60

**Table 2. Box-Behnken experimental design with the independent variables**

Run	Coded variable levels			Yield of astaxanthin (μg/g)	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Actual values	Predicted values
1	-1	-1	0	14.03	14.01
2	1	-1	0	15.25	15.17
3	-1	1	0	16.74	16.83
4	1	1	0	17.54	17.55
5	-1	0	-1	14.82	15.07
6	1	0	-1	16.17	16.49
7	-1	0	1	17.06	16.73
8	1	0	1	17.44	17.19
9	0	-1	-1	14.21	13.97
10	0	1	-1	17.12	16.79
11	0	-1	1	15.04	15.37
12	0	1	1	17.52	17.75
13	0	0	0	16.43	16.41
14	0	0	0	16.42	16.41
15	0	0	0	16.45	16.41
16	0	0	0	16.41	16.41
17	-1	-1	0	14.02	14.01

지는 17-run BBD 실험은 추출조건의 최적화를 위해 이차 반응 표면을 사용하였다. 다섯 개의 중심 점은 실험공정의 안정성과 내재된 다양성 및 새우껍질로부터 astaxanthin의 추출 수율을 측정하기 위해 설정하였고, 코드 단위로 설계된 변수는 반응의 예측 값과 실험 값을 Table 2에 나타내었다. 각 조건에 따른 실험은 여러 번(3회 이상) 수행하였으며 Table 2에 나타난 다당류의 추출 수율은 안정된 실험 값의 평균값을 나타낸다. 반면 RSM 예측 값은 앞서 언급한 소프트웨어의 이차 모델에 적합한 기술로 얻었다. 식 (2)의 예측 방정식은 BBD 모델로 실험 데이터에 맞추어 얻은 것이며, 반응(추출 수율) 사이의 경험적 관계를 나타낸다.

$$Y=16.41+0.47 X_1+1.30 X_2+0.59 X_3-0.062 X_1^2-0.46 X_2^2$$

**Table 3. Analysis of variance of the experimental results of the BBD**

Variables	Sum of squares	DF	Mean square	F value	P value prob. >F
Model	19.32	9	2.15	21.97	0.0003
X <sub>1</sub>	1.76	1	1.76	17.99	0.0038
X <sub>2</sub>	13.49	1	13.49	138.13	<0.0001
X <sub>3</sub>	2.81	1	2.81	28.75	0.0011
X <sub>1</sub> x X <sub>1</sub>	0.016	1	0.016	0.17	0.6961
X <sub>2</sub> x X <sub>2</sub>	0.90	1	0.90	9.20	0.0190
X <sub>3</sub> x X <sub>3</sub>	0.0018	1	0.0018	0.018	0.8967
X <sub>1</sub> x X <sub>2</sub>	0.044	1	0.044	0.45	0.5232
X <sub>1</sub> x X <sub>3</sub>	0.24	1	0.24	2.41	0.1647
X <sub>2</sub> x X <sub>3</sub>	0.046	1	0.046	0.47	0.5137
Residual	0.68	7	0.098	-	-
Lack of fit	0.68	3	0.23	200.39	<0.0001
Pure error	0.0045	4	0.0011	-	-
Correlation total	20.00	16	-	-	-

**Table 4. Analysis of variance for the fitted quadratic polynomial model of extraction of astaxanthin**

Item	Std. dev.	Mean	C.V.%	Press	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>Adj</sub>	R <sup>2</sup> <sub>Pred</sub>	Adeq. precision
Value	0.31	16.18	1.93	10.88	0.9658	0.9218	0.4562	15.779

$$+0.021 X_3^2-0.11 X_1 X_2-0.24 X_1 X_3-0.11 X_2 X_3 \quad (1)$$

각 계수의 의미는 F-test와 *p* value 값을 통해 확인 할 수 있다(Table 3). *p* value는 각 계수의 중요성을 확인하는 도구로 사용되었으며, 또한 각 독립 변수 간의 상호 작용 강도를 표시하는데 사용되었다. 이차 회귀 모델의 ANOVA는 *p* value를 통해 모델의 중요도를 알 수 있는데 그 값이 0.0003으로 매우 낮은 값을 가진다. 다시 말해 낮은 확률의 F-test 값을 의미하므로 모델이 매우 중요하다는 것을 증명할 수 있다. 21.97의 “Model F value”는 모델이 중요하다는 것을 암시하며 “Model F-Value”이 noise 의해 크게 존재할 확률이 0.03%밖에 되지 않음을 나타낸다. “Lack of fit F-value”의 200.39은 Lack of fit 이 pure error와 크게 연관이 있음을 암시하지만 noise에 의해 크게 부각될 가능성은 0.01%에도 못 미친다. Table 3에 회귀 계수 및 상응되는 *p* value를 표시하였다.

각 모델의 *p* value와 그에 상응되는 계수들 (X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>1</sub> ... X<sub>2</sub>, ... X<sub>2</sub> x X<sub>3</sub>)들은 중요하다. 특히 추출 온도(X<sub>2</sub>)는 다른 계수들에 비해 새우껍질에서 astaxanthin 추출수율을 결정하는데 더욱 중요한 요소이다. 결정계수(R<sup>2</sup>=0.9658), 결정계수조정(R<sup>2</sup><sub>Adj</sub>=0.9218)와 유사계수(C.V.=1.93%)는 Table 4에서 확인 할 수 있다. 이들 값은 다항식 모델의 일반적인 유효성 및 정확성을 암시하고 R<sup>2</sup><sub>pred</sub> R<sup>2</sup><sub>adj</sub> 값을 통해 판단한다.

“Adeq. Precision”은 signal에서 noise까지의 비율을 측정할 수 있으며 보통 4 이상의 긴 범위가 바람직하다[21]. “Adeq. Precision” 15.779이면 이 모델은 디자인 공간을 탐색하는데 사용 할 수 있다.

### 3-2. RSM을 이용한 astaxanthin 추출의 최적화

이 반응표면곡선은 최적응답을 위한 각각의 변수의 최적 양을 결정하고 각 변수의 상호작용을 조사하여 그린다. 각 변수의 최적 값은 회귀방정식을 통해 얻어지게 되고, 회귀방정식은 Design-Expert 소프트웨어를 사용하여 풀었다. 3차원 반응 표면과 2차원 등고선 평면도는 Fig. 2~4처럼 회귀방정식의 그래픽 표현으로 제공되고 각각의 등고선 곡선은 세 가지의 독립변수 중 한 가지는 0에 고정시키고

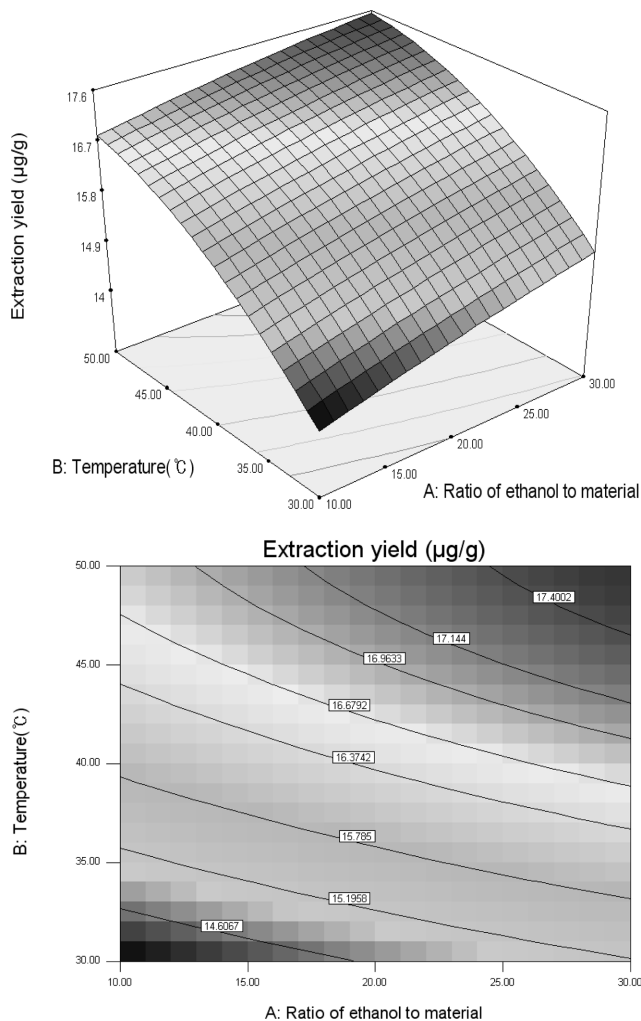


Fig. 2. Effect of ratio of ethanol to raw material, temperature and their reciprocal interaction on extraction yield (with extraction time is constant at 40 min). (a) 3D response surface; (b) 2D contour plots).

나머지 두 변수 조합의 무한 값을 나타낸다. Fig. 2(a)와 (b)는 추출 시간을 40분으로 고정시킨 상황에서 새우껍질에서 astaxanthin 추출 시 첨가된 에탄올 용매의 비, 추출온도 그리고 이 둘의 상호작용에 관한 효과를 볼 수 있다. Astaxanthin은 첨가된 에탄올의 비가 10에서 30으로 갈수록, 추출온도가 30 °C에서 50 °C로 갈수록 추출 양이 증가하였다. Fig. 3(a)와 (b)는 40 °C의 추출온도에서 추출 시 첨가된 에탄올 용매의 비, 추출시간 그리고 이들 사이의 상호작용에 관해 그 래픽으로 표현하였다. Astaxanthin 양은 -1레벨에서 1레벨로 갈수록 증가하였지만 Fig. 2에 비해 증가량이 적은 것을 볼 수 있다. 마지막으로 Fig. 4(a)와 (b)는 추출에 첨가된 에탄올의 비가 20일 때 추출 온도 및 추출시간에 관한 효과를 나타낸다. Fig. 4 또한 Fig. 2와 비슷하게 추출온도 및 추출시간이 증가함에 따라 astaxanthin이 크게 증가하는 것을 볼 수 있다.

RSM 분석을 통해 찾아낸 새우껍질로부터 astaxanthin의 최적 추출조건은  $X_1$ 이 0.97 레벨 즉 1:29.7,  $X_2$ 는 0.95 레벨 즉 49.5 °C,  $X_3$ 는 0.99 레벨인 59.9 분이고 이때 예측되는 추출량은 17.80 μg/g이다. Fig. 5는 모델 식을 회귀분석에 의해 분석된 추출 수율을 나타내었다.

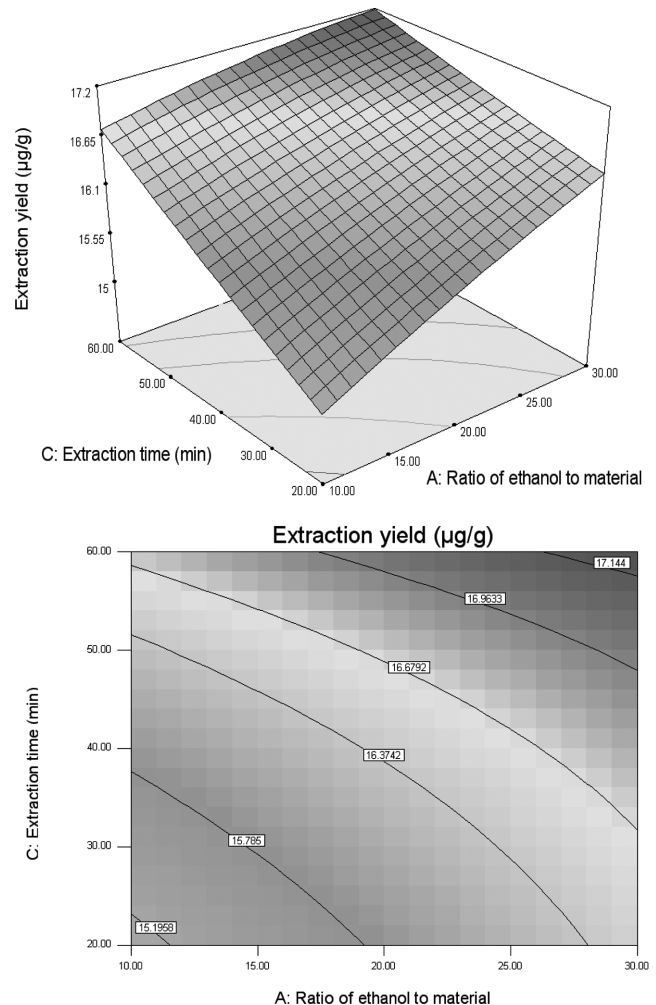


Fig. 3. Effect of ratio of ethanol to raw material, extraction time and their reciprocal interaction on extraction yield (with temperature is constant at 40 °C). (a) 3D response surface; (b) 2D contour plots).

### 3-3. RSM 모델의 유효성 검사

위 RSM 모델에서 예측을 확인하기 위해 새우껍질에서 astaxanthin 추출 실험을 세 독립 변수가 적용된 최적 추출 조건으로 반복하여 실험하였다. 그 결과 astaxanthin의 추출 수율은 17.77 μg/g가 나왔고 이는 RSM 모델식이 예측한 추출 수율이 실제 추출 수율과 차이가 많이 나지 않음을 볼 수 있고, RSM이 추출 수율의 최적화를 결정하는데 적절한 방법임을 나타내었다.

## 4. 결 론

RSM을 이용하여 astaxanthin을 새우껍질로부터 최적추출 조건을 찾는 것은 매우 유용한 방법이다. 그 이유로 모델의 결정계수 즉  $R^2$  값이 0.9658이고 0.0003의 확률 값  $p$ 는 본 회귀모델이 높은 중요성을 가지고 있다는 것을 보이고 있다. 본 모델 식을 이용하여 새우껍질로부터 astaxanthin의 최적 추출조건은 에탄올 용매의 비는 1:29.7으로 추출온도는 49.5 °C 그리고 추출시간은 59.9 분이었고, 이 조건에서 astaxanthin의 추출 수율은 17.80 μg/g로 예측 되었다. 최적 추출조건으로 astaxanthin 추출을 실험하여 RSM을 검증해 본 결과

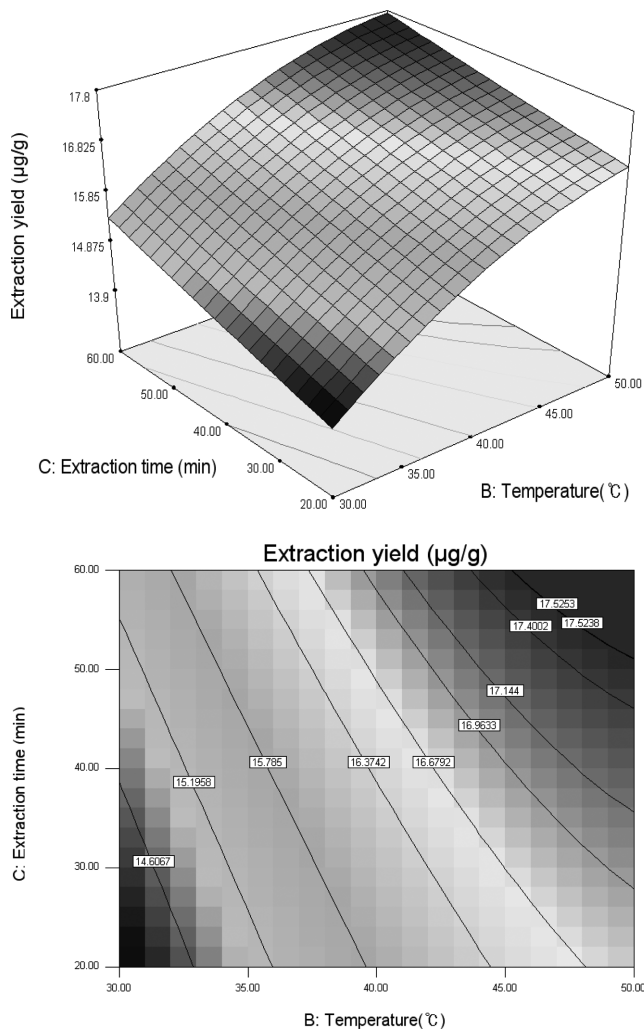


Fig. 4. Effect of temperature, extraction time and their reciprocal interaction on extraction yield (with initial ratio of ethanol to raw material is constant at 20) (a. 3D response surface; b. 2D contour plots).

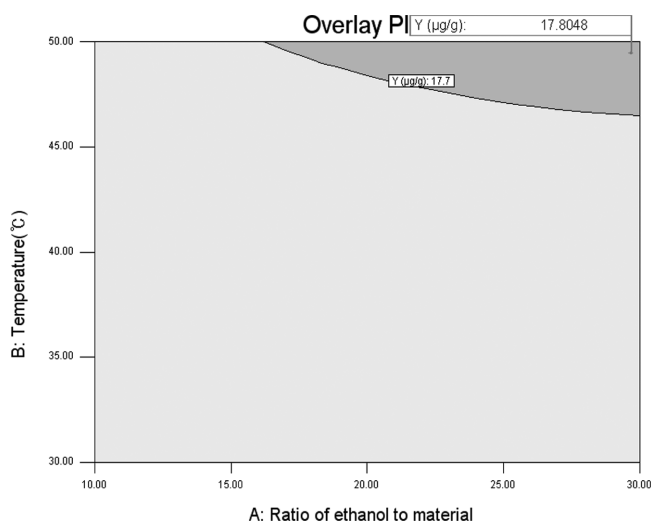


Fig. 5. Predicted optimum values of extraction yield of astaxanthin by the BBD (yield=17.80  $\mu\text{g/g}$ , when  $X_1=1:29.7$ ,  $X_2=49.5^\circ\text{C}$  and  $X_3=59.9$  min).

17.77  $\mu\text{g/g}$ 으로 예측 수율과 차이가 많이 나지 않음을 보였다. 이 연구를 통해 추출공정에서 최적추출조건을 미리 예상할 수 있어 공정 분야 기초연구에 많은 도움을 줄 것으로 생각된다

## 사용기호

$b_0$	: Constant coefficient
$b_i, b_{ii}, b_{ij}$	: Interaction coefficient
F	: Fisher variation ratio
p	: Probability value, Prob > F
$R^2$	: Correlation coefficient
$R^2_{Adj}$	: Adjusted coefficient of determination
$X_i$	: Process specific variables
Y	: Response variable
BBD	: Box-Behnken Design
CCD	: Central Composite Design
RSM	: Response Surface Methodology

## 감 사

본 연구는 한국연구재단(NRF)의 일반과학연구 지원사업(2011-0002642)에 의하여 고순도 분리 연구실에서 수행되었습니다.

## 참고문헌

- Shimidzu, N., Goto, M. and Miki, W., "Carotenoids as Singlet Oxygen Quenchers in Marine Organisms," *Fisheries Sci.*, **62**, 134-137(1996).
- Hong, S. P., Kim, M. H. and Hwang, J. K., "Biological Functions and Production Technology of Carotenoids," *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 1297-1306(1998).
- During, A., Nagao, A. and Terao, J., " $\beta$ -Carotene 15,15'-dioxygenase Activity and Cellular Retinol-Binding Protein Type II Level are Enhanced by Dietary Unsaturated Triacylglycerols in Rat Intestines," *J. Nutr.*, **128**, 1614-1619(1998).
- Naguib, Y. M., "Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids," *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1150-1154(2000).
- Nakagawa, K., Kang, S. D., Park, D. K., Handelman, G. J. and Miyazawa, T., "Inhibition by  $\beta$ -Carotene and Astaxanthin of NADPH-Dependent Microsomal Phospholipid Peroxidation," *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **43**, 345-355(1997).
- Chew, B. P., Park, J. S., Wong, M. W. and Wong, T. S., "A Comparison of the Anticancer Activities of Dietary  $\beta$ -Carotene, Canthaxanthin and Astaxanthin in Mice *in vivo*," *Anticancer Res.*, **19**, 1849-1854(1999).
- Jyonouchi, H., Sun, S., Iijima, K. and Gross, M. D., "Antitumor Activity of Astaxanthin and Its Mode of Action," *Nutr. Cancer*, **36**, 59-65(2000).
- Kistler, A., Liechti, H., Pichard, L., Wolz, E., Oesterheld, G., Hayes, A. and Maurel, P., "Metabolism and CYP-Inducer Properties of Astaxanthin in Man and Primary Human Hepatocytes," *Arch. Toxicol.*, **75**, 665-675(2002).
- Kurihara, H., Koda, H., Asami, S., Kiso, Y. and Tanaka, T., "Contribution of the Antioxidative Property of Astaxanthin to Its

- Protective Effect on the Promotion of Cancer Metastasis in Mice Treated with Restraint Stress," *Life Sci.*, **70**, 2509-2520(2002).
10. Bendich, A., "Non Vitamin a Activity of Carotenoids: Immune Enhancement," *Food Sci. Technol. Res.*, **2**, 127-130(1991).
  11. Tomita, Y., Jyonouchi, H., Engelman, R. W., Day, N. K. and Good, R. A., "Preventive Action of Carotenoids on the Development of Lymphadenopathy and Proteinuria in MRL-lpr/lpr Mice," *Autoimmunity*, **16**, 95-102(1993).
  12. Jyonouchi, H., Zhang, L. and Tomita, Y., "Studies of Immunomodulating Actions of Carotenoids. II. Astaxanthin Enhances in Vitro Antibody Production to T-Dependent Antigens Without Facilitating Polyclonal B-Cell Activation," *Nutr. Cancer.*, **19**, 269-280(1993).
  13. Kritchevsky, S. B., "Beta-carotene, Carotenoids and the Prevention of Coronary Heart Disease," *J. Nutr.*, **129**, 5-8(1999).
  14. Aghdassi, E. and Allard, J. P., "Breath Alkanes as a Marker of Oxidative Stress in Different Clinical Conditions," *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 880-886(2000).
  15. O'Connor, I. and O'Brien, N., "Modulation of UVA Light-induced Oxidative Stress by Beta-Carotene, Lutein and Astaxanthin in Cultured Fibroblasts," *J. Dermatol. Sci.*, **16**, 226-230(1998).
  16. Jacques, P. F., "The Potential Preventive Effects of Vitamins for Cataract and Age-Related Macular Degeneration," *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **69**, 198-205(1999).
  17. Lyle, B. J., Mares-Perlman, J. A., Klein, B. E., Klein, R. and Greger, J. L., "Antioxidant Intake and Risk of Incident Age-related Nuclear Cataracts In the Beaver Dam Eye Study," *Am. J. Epidemiol.*, **149**, 801-809(1999).
  18. Gradelet, S., Le Bon, A. M., Berqès, R., Suschetet, M. and Astorq, P., "Dietary Carotenoids Inhibit Aflatoxin B1-Induced Liver," *Carcinogenesis*, **19**, 403-411(1998).
  19. Chen, X., Chen, R., Guo, Z. and Li, P., "The Preparation and Stability of the Inclusion Complex of Astaxanthin with  $\beta$ -Cyclodextrin," *Food Chem.*, **101**, 1580-1584(2007).
  20. Schroeder, W. A. and Johnson, E. A., "Antioxidant Role of Carotenoids in *Phaffia Rhodozyma*," *J. Gen. Microbiol.*, **39**, 907-912(1993).
  21. Zhu, T., Heo, H. J. and Row, K. H., "Optimization of Crude Polysaccharides Extraction from *Hizikia Fusiformis* Using Response Surface Methodology," *Carbohydr. Polym.*, **82**, 106-110(2010).
  22. Aleboyeh, A., Daneshvar, N. and Kasiri, M. B., "Optimization of C.I. Acid Red 14 Azo Dye Removal by Electrocoagulation Batch Process with Response Surface Methodology," *Chem. Eng. and Proc.*, **47**, 827-832(2008).