

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E42162



STUDY ON GROWTH AND ASTAXANTHIN PRODUCTION BY  
*Xanthophyllomyces dendrorhous*  
USING PINEAPPLE JUICE BASE GROWTH MEDIUM

MISS SOFIA ABDULLAH

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)  
SCHOOL OF BIORESOURCES AND TECHNOLOGY  
KING MONGKUT'S UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THONBURI  
2010



E42162

Study on Growth and Astaxanthin Production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*  
Using Pineapple Juice Base Growth Medium

Miss Sofia Abdullah B.Sc. (Biology)

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for  
the Degree of Master of Science (Biotechnology)  
School of Bioresources and Technology  
King Mongkut's University of Technology Thonburi  
2010

Thesis Committee



.....  
Phenjun Mekvichitsaeng

Chairman of Thesis Committee

(Asst. Prof. Phenjun Mekvichitsaeng, Ph.D)

.....  
Saengchai Akeprathumchai

Member and Thesis Advisor

(Lect. Saengchai Akeprathumchai, Ph.D)

.....  
Kanokwan Poomputsa

Member and Thesis Co-Advisor

(Asst. Prof. Kanokwan Poomputsa, Ph.D)

.....  
Vasimon Ruanglek

Member

(Lect. Vasimon Ruanglek, Ph.D)

.....  
Pongsuda Pongtanya

Member

(Lect. Pongsuda Pongtanya, Ph.D)



Thesis Title	Study on Growth and Astaxanthin Production by <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> Using Pineapple Juice Base Growth Medium
Thesis Credits	12
Candidate	Miss Sofia Abdullah
Thesis Advisors	Dr. Saengchai Akeprathumchai Asst. Prof. Dr. Kanokwan Poomputsa
Program	Master of Science
Field of Study	Biotechnology
Department	Biotechnology
Faculty	School of Bioresources and Technology
B.E.	2553

### Abstract

**E 42162**

Astaxanthin, a potent antioxidant, has gained considerable attention in several applications such as food and feed supplement as well as pharmaceutical industries. However, synthetic astaxanthin is expensive and poses safety concern when applying as feed additive. Therefore, biologically synthesized astaxanthin represents a safer alternative. *Xanthophyllomyces dendrorhous* is the red yeast capable of synthesizing astaxanthin as its major carotenoid pigment. As wild types in general produce low pigment concentration, therefore, objective of this study was to (i) identify effective supplements and chemical enhancers significantly influencing growth as well as astaxanthin production, (ii) optimize the levels of identified factors leading to high growth and astaxanthin production using pineapple juice concentrate base growth medium, a sugar as well as amino acid rich medium derived from canned pineapple manufacturing process. Pineapple juice containing total sugar of 10 g/L could efficiently and satisfactorily promote high growth approximately 4.25g/L at day 2 post inoculation and high astaxanthin content and concentration of 241.47  $\mu\text{g/g}_{\text{yeast}}$  and 0.91 mg/L, respectively, at day 6 post inoculation.

Screening conducted on six culturing factors, i.e., sucrose, glucose,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ , *n*-hexadecane, and pH, was accomplished using fractional factorial design (FFD). Results showed that sucrose,  $\text{KNO}_3$ , and *n*-hexadecane were identified factors significantly and

positive by affecting cell growth ( $p < 0.05$ ); however, glucose was considered statistically and negatively significant ( $p < 0.05$ ) for astaxanthin production. The results further suggested that increasing cell growth would increase astaxanthin production since astaxanthin production is directly proportional to the concentration of biomass. Therefore, the most important factors, namely, sucrose,  $\text{KNO}_3$ , and *n*-hexadecane, were adopted for further optimization study by Doehlert design. It was found that pineapple juice concentrate supplemented with sucrose,  $\text{KNO}_3$ , and *n*-hexadecane at the concentration of 40.2, 1.23 g/L, and 8.2%, respectively, yielded the highest biomass production of 13.24 g/L at day 8 post inoculation. Further, in order to enhance astaxanthin production, screening experiment again was conducted on four chemical enhancers, i.e., Pyruvate,  $\text{ZnCl}_2$ , Tween20 and ethanol, using FFD. Among the enhancers selected, Pyruvate and Tween20 were identified as important variables significantly influencing astaxanthin production ( $p < 0.05$ ). The significant factors were subsequently optimized by Doehlert design with the aid of steepest ascent in order to achieve high-level astaxanthin accumulation and found that Pyruvate and Tween20 at the concentration of 49.78 mM and 0.145 %, respectively, led to astaxanthin concentration of 1170  $\mu\text{g/g}_{\text{yeast}}$  at day 9 post inoculum. Further, batch cultivation using 2-Liter fermentor under optimized conditions established previously, namely, pineapple juice concentrate diluted to the final glucose concentration of 10 g/L supplemented with 40.2 g/L sucrose, 1.23 g/L  $\text{KNO}_3$ , 8.2% (v/v) *n*-hexadecane, 49.7 mM Pyruvate, 0.145% Tween20, 1 mM  $\text{ZnCl}_2$ , and 35 mM ethanol, resulted in high biomass production of 17.43 g/L at day 8 post inoculation, whereas, astaxanthin content and astaxanthin concentration of 906.57  $\mu\text{g/g}_{\text{yeast}}$  and 13.57 mg/L, respectively, were also obtained at day 10 of cultivation.

Keywords: Astaxanthin / Doehlert design / Enhancers / Fractional factorial design (FFD) / *Xanthophyllomyces dendrorhous*



หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินของยีสต์ <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> โดยใช้น้ำสับปะรด
หน่วยกิต	12
ผู้เขียน	นางสาวโซเฟีย อับดุลลอฮ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.แสงชัย เอกประทุมชัย ผศ.ดร.กนกวรรณ พุ่มพุดรา
หลักสูตร	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
สายวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
คณะ	ทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
พ.ศ.	2553

### บทคัดย่อ

**E 42162**

แอสตาแซนทินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพและได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางในการใช้งานด้านต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ผลิตภัณฑ์อาหารเลี้ยงสัตว์ และอุตสาหกรรมยา การใช้แอสตาแซนทินสังเคราะห์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ซึ่งมีข้อจำกัด คือ มีราคาแพงและผู้บริโภคคำนึงถึงความปลอดภัยในการใช้สารเคมีในอาหาร ดังนั้น แอสตาแซนทิน ที่ได้จากธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกที่ดีและปลอดภัยกว่า แอสตาแซนทินที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี ยีสต์ *X. dendrorhous* สามารถสังเคราะห์แอสตาแซนทินเป็นรงควัตถุหลัก อย่างไรก็ตามโดยปกติยีสต์ *X. dendrorhous* ชนิด wild type สามารถสังเคราะห์แอสตาแซนทินได้ในปริมาณน้อย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) คัดเลือกปัจจัยและสารส่งเสริมที่มีประสิทธิภาพ กระตุ้นการเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินของยีสต์ *X. dendrorhous* (2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินโดยใช้น้ำสับปะรดเข้มข้นจากโรงงานอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋อง เนื่องจากน้ำสับปะรดเข้มข้นจากโรงงานอุดมด้วยน้ำตาลและกรดอะมิโนในปริมาณมาก และเมื่อเลี้ยงยีสต์ในน้ำสับปะรดที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตรพบว่าให้ปริมาณเซลล์สูงสุด 4.25 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 2 การเพาะเลี้ยงและให้แอสตาแซนทินสูงสุดเท่ากับ 241.47 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์ และ 0.91 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง

ทำการทดลองคัดเลือปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างแอสตาแซนทินของยีสต์ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส แอมโมเนียมซัลเฟต โพลีเอทิลีนไกลคอล *n*-hexadecane และค่าพีเอช โดยใช้วิธีการทางสถิติ fractional factorial design (FFD) พบว่า โพลีเอทิลีนไกลคอล น้ำตาลซูโครส และ *n*-

**E42162**

hexadecane เป็นปัจจัยที่มีผลทางด้านบวกต่อการเจริญของยีสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำตาลกลูโคส เป็นปัจจัยที่มีผลทางด้านลบต่อการสร้างแอสตาแซนทินของยีสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) อีกด้วย เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของแอสตาแซนทินเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อการเจริญของยีสต์ ดังนั้น จึงนำปัจจัยที่ผ่านการคัดเลือกมาทำการทดลองต่อเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์โดยใช้วิธีการทางสถิติ Doehlert design และพบว่าน้ำสับปะรดที่เสริมโพแทสเซียมไนเตรต น้ำตาลซูโครส และ *n*-hexadecane ที่ความเข้มข้น 1.23, 40.2 กรัมต่อลิตรและ 8.2% ตามลำดับ ได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 13.24 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองต่อเพื่อคัดเลือกสารส่งเสริมที่มีผลต่อการสร้างแอสตาแซนทินของยีสต์ ได้แก่ Pyruvate,  $ZnCl_2$ , Tween20 และเอทานอลด้วยวิธีทางสถิติ FFD และจากสารส่งเสริมทั้งหมดที่เลือกพบว่า Pyruvate และ Tween20 เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างแอสตาแซนทินของยีสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) นำสารส่งเสริมดังกล่าวที่ถูกคัดเลือกไปทำการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างแอสตาแซนทินด้วยวิธีการทางสถิติ Doehlert design ร่วมกับวิธี steepest ascent เพื่อให้ได้ปริมาณแอสตาแซนทินสูงสุด และพบว่า Pyruvate และ Tween20 ที่ความเข้มข้น 49.78 มิลลิโมลาร์ และ 0.145 % ให้ปริมาณแอสตาแซนทินสูงสุดเท่ากับ 1170 มิลลิกรัมต่อกรัมยีสต์ ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นทำการทดลองในถังหมักขนาด 2 ลิตร ด้วยส่วนผสมทั้งหมดที่ถูกคัดเลือกมาซึ่ง ได้แก่ โพแทสเซียมไนเตรต 1.23 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 40.2 กรัมต่อลิตร *n*-hexadecane 8.2 % Pyruvate 49.78 มิลลิโมลาร์ Tween20 ที่ความเข้มข้น 0.145 %  $ZnCl_2$  1 มิลลิโมลาร์ และ เอทานอล 35 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับน้ำสับปะรดซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร พบว่าได้เซลล์สูงสุดเท่ากับ 17.43 กรัมต่อลิตรในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง และให้แอสตาแซนทินสูงสุดเท่ากับ 906.57 มิลลิกรัมต่อกรัมยีสต์ หรือ 13.57 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง

คำสำคัญ: แอสตาแซนทิน / Doehlert design / สารส่งเสริม / Fractional factorial design (FFD) /

*Xanthophyllomyces dendrorhous*



## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank all people who have helped and inspired me during my master degree study.

First and foremost I offer my sincerest gratitude to my supervisor, Dr. Saengchai Akeprathumchai, for his guidance, patience knowledge and financial assistance during my research and study at King Mongkut's University of Technology Thonburi. His perpetual energy and enthusiasm in research had motivated all his advisees, including me. In addition, he was always accessible and willing to help his students with their research. As a result, research life became smooth and rewarding for me.

I gratefully acknowledge Asst. Prof. Dr. Kanokwan Poomputsa by attending her classes, having her as my co-advisor and valuable advising in discussion. I would like to thank Asst. Prof. Dr. Phenjun Mekvichitsaeng for her generous advice and financial assistance. I gratefully thank Dr. Vasimon Ruanglek and Dr. Pongsuda Pongtanya for their constructive comments on this thesis. I am thankful that in the midst of all their activity, they accepted to be members of the reading committee.

My time at KMUTT was made enjoyable in large part due to the many friends and groups that became a part of my life. I am grateful for time spent with all my lab buddies at the Animal Cell Culture (ACC) laboratory made it a convivial place to work and had inspired me in research and life through our interactions during the long hours in the lab. Thanks.

I acknowledge the King Mongkut's Dimond scholarship for financial support of my study.

My deepest gratitude goes to my parents who deserve special mention for their inseparable support and prayers. My Father is the person who put the fundament my learning character, showing me the joy of intellectual pursuit ever since I was a child. My Mother is the one who sincerely raised me with her caring and gently love.

Finally, I would like to thank everybody who was important to the successful realization of thesis, as well as expressing my apology that I could not mention personally one by one.

## CONTENTS

	PAGE
ENGLISH ABSTRACT	ii
THAI ABSTRACT	iv
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	xii
NOMENCLATURE	xv
<b>CHAPTER</b>	
<b>1. INTRODUCTION</b>	1
1.1 Background	1
1.2 Objectives	2
1.3 Research Outline	2
1.4 Expected Output	3
<b>2. LITERATURE REVIEWS</b>	4
2.1 Astaxanthin	4
2.2 Properties of Astaxanthin	5
2.3 Source of Astaxanthin	7
2.4 <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	9
2.5 Factors Affecting Growth and Astaxanthin Production	10
2.6 Pineapple Juice Concentrate	21
2.7 Screening Experimental Design	24
2.8 Optimization Experimental Design	28
2.9 Path of Steepest Ascent	34
<b>3. RESEARCH METHODOLOGY</b>	36
3.1 Instruments and Chemicals	36
3.2 Microbial Strain	37
3.3 Pineapple Juice Preparation	38
3.4 Measurement of Biomass	38
3.5 Astaxanthin Extraction	38
3.6 Determination of Sugar Concentration using HPLC	39
3.7 Cultivation of <i>X. dendrorhous</i> on YM Medium and Pineapple Juice Medium	39
3.8 Screening of Factors Affecting Growth by Fractional Factorial Design (FFD)	39



3.9 Optimization of Growth using Doehlert Design	41
3.10 Screening of Factors Affecting Astaxanthin Production by Fractional Factorial Design (FFD)	43
3.11 Optimization of Astaxanthin Production using Doehlert Design	45
3.11.1 Path of Steepest Ascent	45
3.11.2 Optimization of Astaxanthin Production using Doehlert Design	46
3.12 Validation Study in 2 Liter Fermentor	48
<b>4. RESULTS AND DISCUSSION</b>	49
4.1 Pineapple Juice Characterization	49
4.2 Cultivation of <i>X. dendrorhous</i> in Traditional YM Medium and Pineapple Juice Base Medium	53
4.3 Screening of Factors Affecting Growth of <i>X. dendrorhous</i> by The Fractional Factorial Design	56
4.4 Optimization of Growth using Doehlert Design	67
4.5 Screening of Factors Affecting Astaxanthin Biosynthesis of <i>X. dendrorhous</i> by The Fractional Factorial Design	76
4.6 The Steepest Ascent	79
4.7 Optimization of Astaxanthin Biosynthesis by <i>X. dendrorhous</i> using Doehlert Design	81
4.8 Batch Cultivation in 2 Liter Fermentor	89
<b>5. CONCLUSIONS</b>	97
5.1 Conclusions	97
5.2 Recommendation	99
<b>REFERENCES</b>	101
<b>APPENDICES</b>	118
APPENDIX A Statistical Results	119
APPENDIX B Standard Curve	123
APPENDIX C Experimental Design	130
<b>CURRICULUM VITAE</b>	136

## LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
2.1 Effects of carbon sources on growth and astaxanthin production by <i>X. dendrorhous</i>	11
2.2 Effects of nitrogen sources on growth and astaxanthin production by <i>X. dendrorhous</i>	12
2.3 Pineapple production in year 2004-2008	21
2.4 Characteristics of liquid pineapple juice by product	23
2.5 Amino acid profile of pineapple juice concentrate	24
2.6 Number of experimental runs of fractional factorial design with 9 and 10 factors at different resolutions	27
2.7 Characteristics of design resolutions	27
2.8 Comparison of efficiency of central composite design (CCD), Box-Behnken design (BBD) and Doehlert design (DD)	29
2.9 Doehlert design for two factors	33
2.10 Doehlert design for three factors	34
3.1 The selected variables together with their corresponding concentrations employed in FFD	40
3.2 Experimental design of $2_{IV}^{6-2}$ fractional factorial design employed	40
3.3 Coded and actual values of the variables tested in Doehlert design for biomass production	42
3.4 Three variable Doehlert experimental design for biomass production	43
3.5 The selected variables and their corresponding concentrations chosen for FFD range	44
3.6 Experimental design of $2_{IV}^{4-1}$ fractional factorial design	44
3.7 Schematic representation of how to construct the path of steepest ascent.	46
3.8 Coded and actual values of the variables employed in Doehlert design for astaxanthin production	47
3.9 Two-variable Doehlert experimental designs for astaxanthin production	47



4.1	Constituents of pineapple juice stock medium (100 g/L total sugar)	50
4.2	Amino acid profile of pineapple juice concentrate	52
4.3	Experimental designs required for $2_{IV}^{6-2}$ fractional factorial design together with responses in terms of cell and astaxanthin concentrations obtained at day 8 post inoculation.	57
4.4	Regressive analyses of $2_{IV}^{6-2}$ fractional factorial design (FFD) using cell concentration attained at day 8 post inoculation as response	59
4.5	Analysis of Variance (ANOVA) for cell concentration by <i>X. dendrorhous</i> at 8 day post inoculation	59
4.6	Analysis of Variance (ANOVA) for astaxanthin production by <i>X. dendrorhous</i> at 8 day of cultivation	62
4.7	Experimental designs and corresponding responses in terms of dry cell weight and astaxanthin accumulation obtained at day 8 post inoculation	68
4.8	Regressive analysis on biomass production by Response Surface Methodology using Doehlert design	69
4.9	Analysis of Variance (ANOVA) for biomass production by <i>X. dendrorhous</i> at 8 day post inoculation	69
4.10	Experimental designs required for $2_{IV}^{4-1}$ fractional factorial design together with responses in terms of astaxanthin concentrations obtained at day 10 post inoculation	77
4.11	Regressive analyses $2_{IV}^{4-1}$ fractional factorial design (FFD) using astaxanthin production attained at day 10 post inoculation as response	78
4.12	Analysis of Variance (ANOVA) for astaxanthin production by <i>X. dendrorhous</i> at 10 day of cultivation	78
4.13	Experimental designs required for steepest ascent together with responses in terms of astaxanthin concentrations obtained at day 9 post inoculation	80
4.14	Experimental designs and corresponding responses in terms of astaxanthin concentration obtained at day 9 post inoculation	82
4.15	Regressive analysis on astaxanthin biosynthesis (astaxanthin content) obtained at 9 day post inoculation by response surface methodology using Doehlert design	83

4.16	Analysis of Variance (ANOVA) for astaxanthin production by <i>X. dendrorhous</i> obtained at 9 day post inoculation	83
5.1	Summary of experimental work in this study	100
A1	Regressive analysis for astaxanthin production using fractional factorial design (FFD)	122
B1	Dry cell weight and corresponding optical density at 660 nm	123
B2	Sucrose concentration and corresponding area detected by HPLC at retention time of 8.3 minutes	124
B3	Glucose concentration and corresponding area detected by HPLC at retention time of 10.2 minutes	125
B4	Fructose concentration and corresponding area detected by HPLC at retention time of 11.9 minutes	126
B5	1-kestose concentration and corresponding area detected by HPLC at retention time of 7.3 minutes	127
B6	Glucose concentration and corresponding optical density at 485 nm	128
C1	Biomass, astaxanthin (content and concentration), total sugar, and TKN present in <i>X. dendrorhous</i> cultivated in YM medium	130
C2	Biomass, astaxanthin (content and concentration), total sugar, and TKN present in <i>X. dendrorhous</i> cultivated in Pineapple juice base medium	130
C3	Experimental designs required for $2^{6-2}_{IV}$ fractional factorial design together with responses in terms of biomass, astaxanthin content, and astaxanthin concentration	131
C4	Experimental designs and corresponding responses in terms of dry cell weight	132
C5	Experimental designs required for $2^{4-1}_{IV}$ fractional factorial design together with responses in terms of cell and astaxanthin concentration	133
C6	Experimental designs required for runs required for steepest ascent together with responses in terms of astaxanthin concentrations	133
C7	Experimental designs and corresponding responses in terms of astaxanthin concentration	134
C8	Biomass concentration and astaxanthin production by <i>X. dendrorhous</i> in 2-liter fermentor	135

## LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Structure of astaxanthin with several configurationally isomers	5
2.2 Singlet oxygen quenching rate of carotenoids and $\alpha$ -tocopherol (Vitamin E)	6
2.3 Glycolytic pathway and pyruvate decarboxylation	18
2.4 Pineapple quantities being used as pineapple juice and residual waste	22
2.5 Doehlert design for two (A) and three (B) variables	30
2.6 Some plane projections of the three-variables Doehlert design leaning: (a) on a square face; (b) on a triangular face; (c) on a vertex	30
3.1 A triangular face plane projections of the three-variable Doehlert design	42
4.1 Typical sugar profile of diluted pineapple juice concentrate	50
4.2 Cultivation of <i>X. dendrorhous</i> in YM (A) and pineapple juice base medium (B). (●) Total sugar, (■) Cell dry weight, (×) TKN, and (▲) Astaxanthin production	54
4.3 The two-way interactive effects between sucrose and $\text{KNO}_3$ (A), and its alias, <i>n</i> -hexadecane and pH (B) glucose and $\text{KNO}_3$ (C), and its alias, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and pH (D)	60
4.4 Pareto charts depicting the influence of sucrose (A), glucose (B), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (C), $\text{KNO}_3$ (D), <i>n</i> -hexadecane (E), and pH (F) on astaxanthin production by <i>X. dendrorhous</i>	62
4.5 The effects of two-way interactions between sucrose and <i>n</i> -hexadecane (A), and its alias, glucose and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (B); glucose and $\text{KNO}_3$ (C), and its alias, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and pH (D); glucose and pH (E), and its alias, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $\text{KNO}_3$ (F) on astaxanthin accumulation by <i>X. dendrorhous</i>	63
4.6 Contour (A) and surface plots (B) representing influence of $\text{KNO}_3$ and sucrose on biomass production	72
4.7 Contour (C) and surface plots (D) depicting influence of $\text{KNO}_3$ and <i>n</i> -hexadecane on biomass production	73



4.8	Contour (E) and surface plots (F) demonstrating influence of sucrose and <i>n</i> -hexadecane on biomass production	74
4.9	Astaxanthin concentration obtained at day 9 post inoculation along the path of steepest ascent	80
4.10	Contour (A) and response surface (B) diagrams of astaxanthin biosynthesis as a function of the concentrations of Pyruvate and Tween20	85
4.11	Cultivation of <i>X. dendrorhous</i> in 2 liter fermentor containing 1.5 L fermentation medium, initial pH at 5.5, inoculated with 10 % (v/v) inoculums culturing at 22 °C, 200 rpm agitation, and 1 vvm aeration providing that (●) Total sugar, (□) Cell dry weight, (×) TKN, and (▲) Astaxanthin production	91
4.12	Cultivation of <i>X. dendrorhous</i> in 2 liter fermentor containing 1.5 L fermentation medium, initial pH at 5.5, with 10 % (v/v) inoculums culturing at 22 °C, 200 rpm agitation, and 1 vvm aeration: (□) Cell Dry Weight, (▲) Astaxanthin Content, (●) Sucrose, (▼) Glucose, (○) Fructose, and (⊕) 1-kestose.	93
4.13	Cultivation of <i>X. dendrorhous</i> in 2 liter fermentor containing 1.5 L fermentation medium, initial pH at 5.5, inoculated with 10 % (v/v) inoculums by culturing at 22 °C, 200 rpm, 1 vvm. Providing that (□) Cell Dry Weight, (▲) Astaxanthin Content, (△) Astaxanthin Concentration, (▽) pH, and (+) dO <sub>2</sub> Concentration	95
A1	Normal probability plot of biomass from the data screening factors influencing growth using fractional factorial design	119
A2	Normal probability plot of astaxanthin of the data from screening factors influencing growth using fractional factorial design	119
A3	Normal probability plot of astaxanthin of the data from optimization of growth using Doehlert design	120
A4	Normal probability plot of astaxanthin of the data from screening factors influencing astaxanthin production	120
A5	Normal probability plot of astaxanthin of the data from optimization of astaxanthin production using Doehlert design	121

A6	Pareto charts depicting the influence of sucrose (A), glucose (B), (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (C), KNO <sub>3</sub> (D), <i>n</i> -hexadecane (E), and pH (F) on growth by <i>X. dendrorhous</i> . Open bars represent positive effect, while close bars represent negative effect	121
B1	Correlation between dry cell weight and optical density at 660 nm	123
B2	Correlation between sucrose concentration and total area under peaks	124
B3	Correlation between glucose concentration and total area under peaks	125
B4	Correlation between fructose concentration and total area under peaks	126
B5	Correlation between 1-kestose concentration and total area under peaks	127
B6	Correlation between glucose concentration and optical density at 485 nm	129

## NOMENCLATURE

g	=	gram
L	=	Liter
g/L	=	gram per liter
mg/L	=	milligram per liter
mg/g	=	milligram per gram
mg/mL	=	milligram per milliliter
mL	=	milliliter
$\mu$ L	=	microliter
OD	=	optical density
$\mu$ g/g <sub>yeast</sub>	=	microgram per 1 gram of yeast dry weight
mg/g <sub>yeast</sub>	=	milligram per 1 gram of yeast dry weight
mM	=	milliMolar
vvm	=	volume per volume per minute (gas volume flow per unit of liquid volume per minute)
v/v	=	volume by volume
w/w	=	weight by weight
°C	=	degree celsius
rpm	=	round per minute
min	=	minute
nm	=	nanometer
ppm	=	part per million
mL/min	=	milliliter per minute