

Growth and Astaxanthin Production of *Phaffia rhodozyma*

## AJ-6 by Fed-batch Culture

김수진, 유연우

아주대학교 대학원 분자과학기술학과

Tel) 0331-219-2455, Fax) 0331-216-8777

## Abstract

Fed-batch culture was designed to increase cell concentration and astaxanthin content by mutant AJ-6 of *Phaffia rhodozyma*. Fed-batch culture was performed in the continuous feeding with manual adjustment of flow rate to control glucose concentration. When the final glucose concentration was 100 g/L, the cell and astaxanthin were 38.3 g/L, 34.8 mg/L, respectively. Addition of ethanol(10 g/L), when glucose was depleted, the cell and astaxanthin concentration were 37.2 g/L and 45.6, respectively. 5 g/L of acetic acid supplied, 40.6 g/L, 43.9 mg/L were obtained. Ethanol and acetic acid enhanced the astaxanthin content act as precursor of carotenoid synthesis.

## 서론

Astaxanthin은 carotenoids의 일종으로서 조류, 곰팡이, 작은 갑각류로부터 생합성되어 먹이사슬에 의하여 어류의 착색 등에 관여한다. 따라서 astaxanthin은 양식산업, 가공산업 및 식품산업에서 색소 풍미원으로 사용될 뿐만 아니라<sup>1,2</sup>, 유해활성산소를 제거하는 강력한 항산화제로서 관심의 대상으로 부각되어 의학적으로도 매우 중요하게 여겨지고 있다<sup>3</sup>.

*Phaffia rhodozyma*의 변이균주인 AJ-6를 이용한 천연색소 astaxanthin의 생산에서 색소의 생산은 균체의 증가와 관련이 있기 때문에 단위 부피당 높은 색소 함량을 얻기 위해서는 고농도의 균체를 얻어야 한다. 따라서 유가식배양 방법에 의하여 고농도의 균체를 생산한 다음에 색소의 축적에 효과적인 새로운 인자를 첨가하여 고농도의 색소를 생산할 수 있는 유가식배양 공정에 대하여 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

본 실험에 사용된 균주는 *Phaffia rhodozyma* AJ-6로 배양온도는 24℃이며, 2.5 L(KoBioTech, Korea) fermentor를 이용하였다. 초기 발효배지의 조성은 glucose와 yeast extract의 농도를 각각 10 g/L로 하였으며, working volume을 1.0 L로 하였다. 유가식 배양을 위한 feed medium의 조성은 130 g/L의 glucose와 65 g/L의 yeast extract로서, 배양액의 최종부피는 1.4 L가 되도록 하였으며, 이때의 최종

glucose 농도는 100 g/L가 되게 하였다. 배지의 공급 방법은 배지내에 glucose가 축적되지 않도록 단계적으로 flow rate를 증가시키면서 feeding 하였다. Feed medium을 모두 공급한 후에 배양액에 glucose 농도가 약 3 g/L가 될 때에 ethanol과 acetic acid는 각각의 농도 별로 공급하여 색소의 축적에 효과가 있는지를 확인하였다.

Carotenoid는 cell에 DMSO를 처리하여 hexane과 ethylacetate를 1:1로 하여 추출하였으며, carotenoid의 농도는  $A_{474}$ 에서 흡광도 값과 건조균체량을 이용하여 1% extraction coefficient = 2100 값으로 정량하였다. Astaxanthin 정량은 Nova-pak C18 column (Waters, USA)을 이용하여 HPLC로 분석하였다. Detector는 474 nm에서 UV detector를 사용하였고, 이동상은 methanol : acetonitrile(75:25)를 1.0 mL/min의 유속으로 분석하였다.

### 결과 및 고찰

*Phaffia rhodozyma* AJ-6를 이용하여 고농도의 균체를 얻기 위한 glucose와 yeast extract 만을 이용하여 유가식 배양을 수행한 결과 균체량과 astaxanthin의 농도는 각각 38.3 g/L와 34.8 mg/L를 얻을 수 있었다.

Feed medium에서 공급되는 glucose와 yeast extract 만을 갖고 배양한 경우는 feed medium의 조성이 cell 성장을 위해 최적화된 배지로서, 색소의 축적보다는 대부분이 세포 성장을 위해 소비되었기 때문에 색소의 함량은 낮았다. 색소의 축적을 증진시키기 위해 색소 축적에 효과가 있는 새로운 인자로서 ethanol과 acetic acid를 이용하였다.

Astaxanthin의 함량을 증진시키기 위하여 astaxanthin의 축적에 효과가 있는, 즉 ethanol과 acetic acid를 각각 유가식 배양 후에 배양액에 glucose 농도가 약 3 g/L 이하 일 때에 첨가하였다. Ethanol은 5, 10, 15 g/L를 각각 공급해 주었다. 10 g/L를 첨가했을 때에 astaxanthin의 축적에 가장 효과적 이었으며, 이때의 astaxanthin의 농도는 45.6 mg/L이고 균체량은 37.2 g/L 으로서 ethanol를 첨가하지 않은 경우에 비하여 최종 균체량은 감소하였으나, astaxanthin의 생산은 1.3배 증가하였다.(Table 1, Fig. 1). Acetic acid를 5, 10, 15 g/L를 첨가한 경우는 5 g/L 일 때 43.9 mg/L의 astaxanthin과 40.6 g/L의 균체량을 얻을 수 있었다. 이때에는 acetic acid를 첨가하지 않은 경우보다 균체량과 astaxanthin의 생산이 모두 증가하였다(Fig. 2). 그러나 acetic acid의 농도가 증가할수록 최종 균체량과 astaxanthin의 생산이 감소하였다. 결과적으로, ethanol 10 g/L와 acetic acid 5 g/L의 경우는 cell에 별다른 영향을 주지 않으면서 색소의 축적이 효과적임을 나타내었다. 이는 ethanol과 acetic acid가 *Phaffia rhodozyma* AJ-6에 있어서 cell growth에 이용되는 primary carbon source 이기 보다는 carotenoid 합성을 위한 전구체인 acetyl-CoA로 이용되면서

astaxanthin의 축적에 보다 효과적임을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Johnson, E. A. and G-H An. Astaxanthin from microbial sources (1991), *Crit. Rev. Biotechnol.* 11, 297-326
2. An, G-H, D. B. Schuman and E. A. Johnson. Isolation of *Phaffia rhodozyma* Mutants with Increased Astaxanthin Content (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(1), 116-124
3. Miki, M. Biological Functions and Activities of Carotenoids (1991) *Pure Appl Chem.* 63(1), 141-146.
4. Yamane, Y-I, K. Higashida, Y. Nakashimada, T. Kakizono, and N. Nishio. Influence of Oxygen and Glucose on Primary Metabolism and Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* in Batch and Fed-Batch Cultures: Kinetic and Stoichiometric Analysis (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* 63(11), 4471-4478.

Table 1. Comparison of cell growth and astaxanthin production for the various ethanol feeding in fed-batch cultures.

Culture conditions	Cell mass (g/L)	Astaxanthin (mg/L)	Total carotenoid (mg/L)
Control	38.25	34.77	40.90
Ethanol 5.0 g/L	34.32	39.96	45.98
Ethanol 10.0 g/L	37.15	45.62	50.02
Ethanol 15.0 g/L	30.90	38.27	44.86

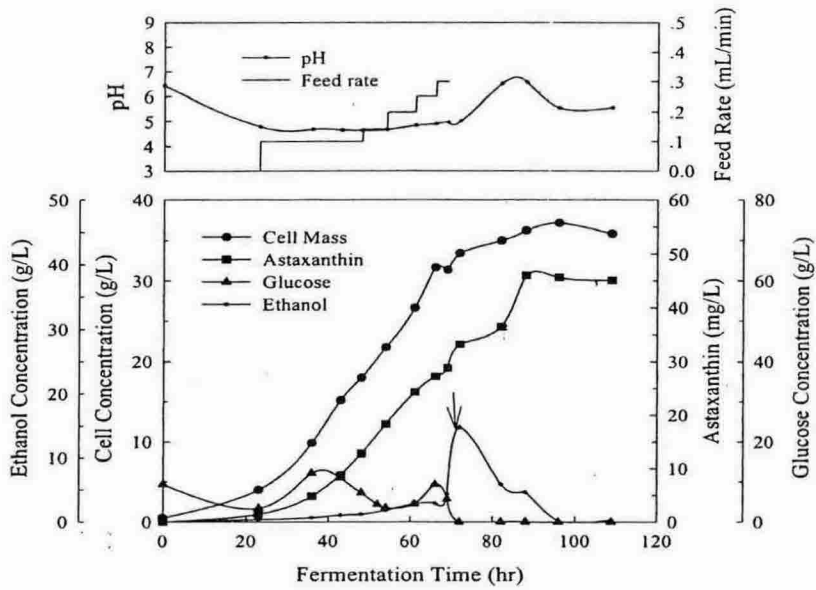


Fig. 1 Fed-batch fermentation of *Phaffia rhodozyma* AJ-6. Arrow indicates the feeding of 10 g/L ethanol added. DO concentration was maintained above 40 %.

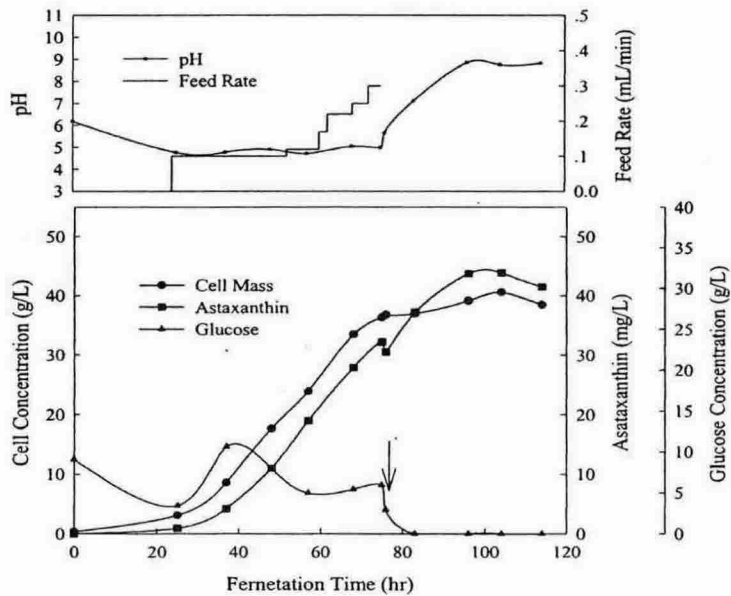


Fig. 2 Fed-batch culture of *Phaffia rhodozyma* AJ-6. Arrow indicates the feeding of 5 g/L acetic acid added. DO concentration was maintained above 40 %.