

Optimization of Growth and Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* AJ-6 in Fed-batch Culture

김수진, 유연우

아주대학교 공과대학 분자과학기술학과

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

Abstract

A study was carried out to select a nitrogen source and the optimize the C/N ratio for the maximum cell growth of *Phaffia rhodozyma* in fed-batch culture. The yeast extract was the best organic nitrogen source. In the batch culture experiments, the highest cell yield was obtained 0.575 g-cell/g-glucose from 10 g/L and 10 g/L yeast extract. In the fed-batch experiments, the maximum cell concentration was obtained 33.1 g/L from the C/N ratio of 2:1 while the astaxanthin concentration of cell was increased by increasing the C/N ratio, of feed medium.

서론

Astaxanthin(3,3 -dihydroxy- β, β -carotene-4,4 dione)은 비타민 A의 전구물질인 β -carotene으로 대표되는 carotenoid 계에 속하는 물질로써 가금산업, 양식산업 및 식품산업에서 색소 풍미원으로 사용될 뿐만 아니라 항산화효과를 나타내는 것이 증명되어 의학적으로도 매우 중요하게 여겨지고 있다. 천연 carotenoids 생산에 있어서 주목 받고 있는 *Phaffia rhodozyma*의 산업적 이용을 위해서는 단위부피당 고농도의 색소를 생산하는 것이 중요하다. 본 실험에서 선별된 변이균주 AJ-6에 의한 색소 생산의 경우 색소생성이 균체의 증가와 관련이 있기 때문에 단위부피당 높은 색소함량을 얻기 위해서는 고농도의 균체를 얻어야 한다. 따라서 높은 생산성으로 고농도의 색소함량을 얻기 위한 유가식 배양 공정에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 균주는 *Phaffia rhodozyma* AJ-6로 배양온도는 24℃에서 배양하였으며, 질소원의 선정은 250 mL baffled flask에 50 mL를 working volume으로 glucose 20 g/L를 사용하였다. 초기 glucose의 농도 선정은 2.5 L KFC(Korea Fermentation Co.)를 이용하여 working volume 1L를 사용하였으며, 농도는 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 g/L를 각각 수행하였다.

유가식 배양을 위한 feed medium의 배지 조성은 최종 당 농도가 100 g/L이며, C/N ratio는 1:1, 2:1, 3:1, 4:1로 하였고, 초기 working volume은 0.8 L, 최종은 1.5

L로 하였다.

Carotenoid는 cell에 DMSO를 처리하여 hexane과 ethylacetate 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*는 Crabtree positive cell로 높은 당농도에서 성장이 어려움으로 고농도로 색소를 생성하기 위해서는 먼저 많은 균체량을 얻은 후 색소를 형성시키는 유가식 배양을 필요로 한다. 따라서 먼저 많은 균체량을 얻기 위해 성장이 우수한 초기 발효조건과 공급기질의 농도를 선정하였다. 질소원으로는 yeast extract, bacto peptone, malt extract를 이용하여 실험한 결과, 10 g/L의 yeast extract만을 이용하는 것이 균체량 5.88 g/L로 우수하였다. 10 g/L의 yeast extract를 기준으로 초기 glucose 농도를 선정한 결과 glucose 농도가 10 g/L 일 때 5.81 g/L로 균체 수율면에서 가장 우수하였다. *Phaffia rhodozyma* AJ-6의 초기 세포 성장은 질소원이 풍부하고 공급되는 당 농도와 같은 농도의 질소원 농도에서 우수하였다.

Feed medium의 glucose와 yeast extract의 농도는 glucose:yeast extract가 2:1 일 때에 균체량이 33.08 g/L이고, 이때 astaxanthin의 함량은 22.17 mg/L 였다. 회분식 배양과 같은 조건인 1:1인 경우에는 공급되는 질소원의 농도가 너무 높아 균체 성장과 색소 형성이 우수하지 못하였다. Feed medium의 C/N ratio에 대한 영향에서 *Phaffia rhodozyma* AJ-6는 공급되는 기질의 C/N이 낮을수록 세포 성장에 효과적이고, C/N이 높을수록 색소형성에 효과적임을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Johnson, E. A., Gil-Hwan An. Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. in Biotechnol.* **11**, 297-326 (1991)
2. Yamane, Y., K. Higashida, Y. Nakashimada, T. Kakizono and N. Nishio. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding. *Biotechnol. Lett.* **19**, 1109-1111 (1997)
3. Calo, P., T. de Miguel, J. B. Velazquez, and T. G. Villa. Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Lett.* **17**, 575-578 (1995)

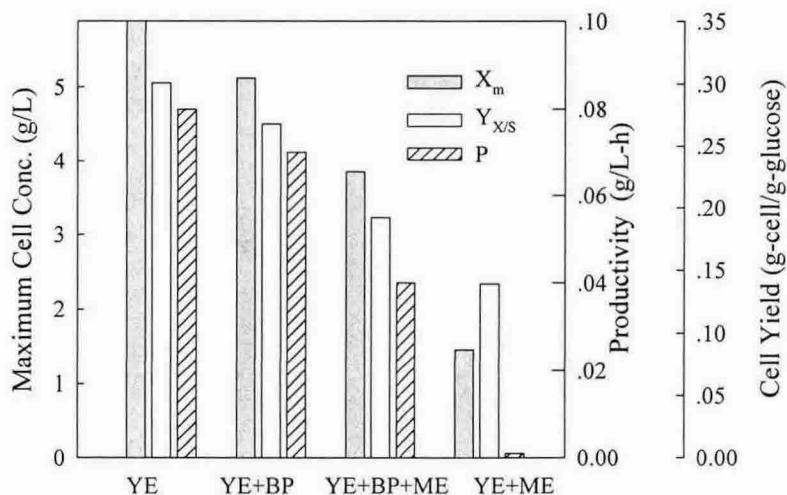


Fig. 1 Effect of various organic nitrogen sources on the cell growth.

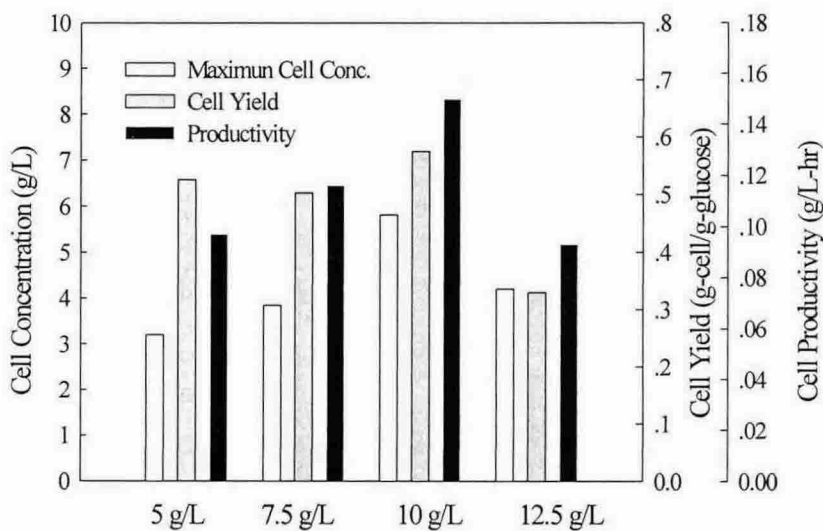


Fig. 2 Effect of initial glucose concentration on the cell growth.

Table 1. Comparison of cell growth and astaxanthin production for the various carbon/nitrogen ratio of feed medium.

	X_m Cell mass (g/L)	Astaxanthin (mg/L)	P (g-cell/L-hr)
G : Y (1 : 1) (140 g : 140 g)	25.14	17.03	0.318
G : Y (2 : 1) (140 g : 70 g)	33.08	22.17	0.348
G : Y (3 : 1) (140 g : 46.7 g)	29.46	24.87	0.335
G : Y (4 : 1) (140 g : 35 g)	27.0	26.58	0.281

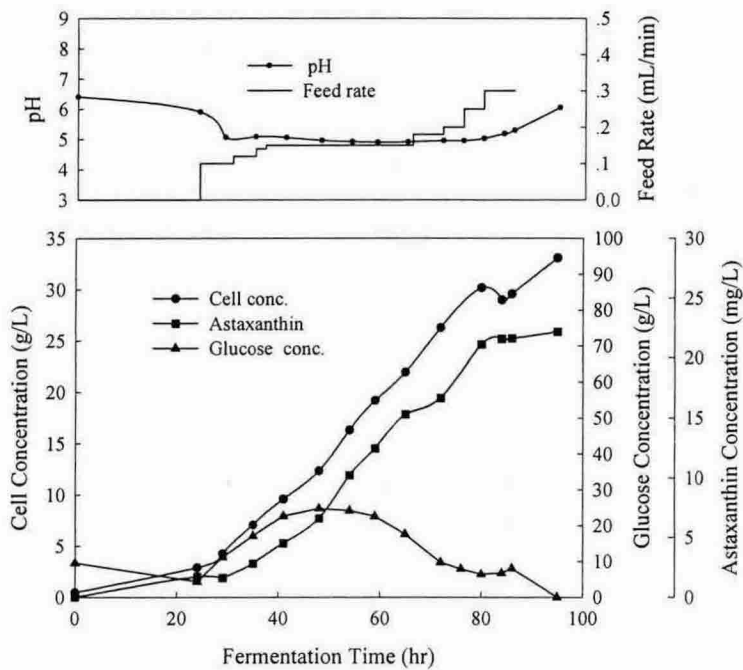


Fig.3 Fed-batch culture of *Phaffia rhodozyma* AJ-6, final glucose concentration was 100 g/L and C/N ratio of feed medium was 2:1. DO concentration was maintained above 40%.