

Phaffia rhodozyma 세포파쇄액으로부터 항산화제 Astaxanthin의 미셀 형성을 통한 가용화 및 추출

¹김 영 범·류 강·²임 교 빈·†이 은 규
한양대학교 화학공학과 생물공정연구실, ¹(주)두산바이오텍, ²수원대학교 화학공학과
(접수 : 2002. 2. 24., 게재승인 : 2002. 4. 22.)

Solubilization and Extraction of Antioxidant Astaxanthin by Micelle Formation from *Phaffia rhodozyma* Cell Homogenate

Young-Beom Kim¹, Kang Ryu, Gio-Bin Lim², and Eun Kyu Lee†

Bioprocessing Research Laboratory, Department of Chemical Engineering, Hanyang University Ansan 425-791, Korea

¹Process Engineering Team, Doosan Biotech, Kyunggi-Do, Korea

²Department of Chemical Engineering, The University of Suwon, Suwon, Korea

(Received : 2002. 2. 24., Accepted : 2002. 4. 22.)

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione), a natural pigment of pink to red color, is widely distributed in nature particularly in the skin layer of salmonoids and the crust of shrimp, lobster, etc. Recently, it was produced from the yeast culture of *Phaffia rhodozyma*. Because of its high thermal stability and antioxidant functionality, its applications can be extended into food, cosmetics, and pharmaceutical ingredient beyond the traditional feed additive. Because of its very high lipophilicity, astaxanthin has been extracted traditionally by strong organic solvents such as chloroform, petroleum ether, acetone, etc. In this study, we developed a surfactant-based solubilization system for astaxanthin, and used it to extract astaxanthin from disrupted yeast cells. Among Tween 20, Triton X-100 and SDS, Tween 20 was identified as the most suitable surfactant in terms of extraction capacity and safety. The ethylene oxide group of Tween 20 was identified as the most significant factor to increase the HLB value that determined the extraction capacity. The effects of micelle formation condition, such as the molar ratio of astaxanthin and Tween 20, pH, and ionic strength were also investigated. pH and ionic strength showed no significant effects. The optimal molar ratio between astaxanthin and Tween 20 was 1 : 12. Antioxidant activity of astaxanthin was higher than β -carotene and α -tocopherol. Astaxanthin in the crude extract from the yeast cell was more resistant to air and/or light degradation than pure astaxanthin, probably because of the presence of other carotenoids and lipids.

Key Words : extraction of astaxanthin, *Phaffia rhodozyma*, antioxidant functionality, micelle, Tween 20

서 론

착색용 사료첨가제로 쓰이고 있는 astaxanthin(3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione)은 일종의 지질계통 물질로서 분자량은 596.85, 용점은 183℃이다. Astaxanthin은 긴 사슬의 isoprene 구조를 가지고 있고, 주홍색을 띠고 있어 연어와 송어 등 양식어류와 계란 등 가금류의 색상, 향, 맛 등을 증가시키는 착색 풍미원으로서 중요한 사료첨가제 역할을 하고 있다. 또한

다른 카로테노이드나 토코페롤보다도 뛰어난 항산화 효과를 가지고 있으며(1-2), 면역증강/억제(3), 혈압강하, 소화촉진 등 여러 가지 기능성들이 밝혀지면서 식품첨가제 및 의약품, 화장품 등의 소재로서의 활용이 기대되고 있는 물질이다(8). Astaxanthin 내의 이중결합들이 색을 내는 원인이 된다고 알려져 있고 방향족 고리의 hydroxyl기와 keto기가 색을 조절하는 것으로 보고되고 있다(4). 또 이 부위에서 산소 radical을 포착하여 공명안정화 반응을 통해 산소 radical을 제거하며, 또한 독성이 강한 phenol 분자의 환상에 치환기로서 수산기가 더해짐에 따라 일반적으로 독성이 저하되고 항산화 활성이 증가한다고 보고되고 있다(5). 현재 astaxanthin의 총 세계 시장은 크게 양식어업과 가금류 등의 목축업 시장으로 양분되는데, 현재 양식어업 시장은 1억 2천 5백만 달러 정도로

†Corresponding Author : Bioprocessing Research Laboratory Dept. of Chem. Eng., Hanyang University, Ansan 425-791, Korea
Tel : +82-31-400-5275, Fax : +82-31-408-3779
E-mail : eklee@hanyang.ac.kr

추산되고 있고, 목축업은 5~10년 이내에 1억 2천 5백만 달러 정도의 잠재적 시장형성이 예상된다. 앞으로도 항산화제에 대한 용도 연구와 기능성 천연식품 섭취를 통한 건강증진에 대한 소비자들의 수요 증대로 astaxanthin의 소비량은 매년 약 15% 수준으로 계속적으로 증가할 것으로 예상되고 있다(6).

천연 astaxanthin은 해양환경에 풍부하게 존재하며 algae, fungi 등으로부터 생합성되어 먹이사슬에 의해 개, 새우, 연어 등으로 이동·축적되어 착색을 야기하는 물질이다(7). 개나 새우 등의 갑각류의 껍질로부터 천연 astaxanthin을 추출하는 전통적인 방법은 부산물을 자원화하는 측면에서 활용 가치가 높으나 갑각류 껍질에 존재하는 다량의 chitin, 회분 등으로 인하여 분리 및 정제하는 과정에 매우 많은 제한요소가 있으므로 실용화가 어렵다(8). 미생물에 의한 astaxanthin 생합성은 *Haematococcus sp.*, *Mycobacterium lacticola*, *Phaffia rhodozyma* 및 *Brevibacterium sp.* 등 다양한 균주들이 생산하는 것으로 알려져 있으나 산업적 가치가 있는 균주는 *H. pluvialis*와 *P. rhodozyma* 등으로 보고되고 있다(9). Algae류의 일종인 *H. pluvialis*를 배양한 astaxanthin 생합성은 높은 농도의 색소(0.2~2%)을 생산할 수 있지만 초대형 수조에서 장시간의 배양기간이 요구되고 또한 생성되는 astaxanthin의 대부분이 ester 형태로 존재하므로 동물에 따라 대사 및 색소 축적에 영향을 주는 단점이 있어 사용이 제한되고 있다(10). 따라서 최근에는 색소를 추출할 필요가 없이 균체 자체가 물고기의 영양원이 될 수 있고 또한 성장이 빠른 *P. rhodozyma*의 이용 가능성에 대한 상업적 관심이 부각되고 있다. *P. rhodozyma*는 algae나 fungi에 비해 배양하기에 용이하여 산업적 생산이 용이할 뿐만 아니라 균체사체에 풍부한 단백질과 색소흡수를 촉진하는 불포화지방산, 비타민 그리고 독특한 풍미를 가지고 있어서 색소원과 동물생육에 필수적인 영양공급원으로서의 역할 등 다양한 장점을 가지고 있다(11).

자연계에서 얻어지는 astaxanthin은 순도가 높지만 배양기간이 길어 경제성이 떨어지는 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위한 방안으로 효모세포에서 고농도로 배양하여 astaxanthin을 대량 생산하는 방법이 있다. 이 경우 astaxanthin의 식품 및 의약품으로의 상품화와 부가가치를 높이기 위해서는 분리정제공정을 단순화하고 고순도로 정제할 필요성이 있다. 기존의 astaxanthin 추출법은 다단계의 유기용매 추출과 증발 및 진공건조 등이 요구되고 있다. 이 공정의 수율은 매우 낮고 막대한 에너지가 요구되며, 잔류 유기용매에 의한 독성으로 식품 및 의약품으로의 이용에 커다란 장애요인이 되고 있다. 따라서 유기용매를 사용하지 않는 새로운 추출법으로서 초임계유체 추출공정이 연구되고 있다(12). 또 다른 방법으로 계면활성제를 이용한 미셀 형성을 통해 친유성인 astaxanthin을 미셀 내부에 가용화시킴으로써 수용액에서 추출할 수 있다. 계면활성제의 집합체인 미셀은 수용액에서 친수성기가 수면 바깥 쪽에 늘어서고, 소수성기가 안쪽에 모여, 어떤 농도 범위에서 구형을 만든다. 친수성기로 이온화한 부분이 바깥 쪽을 향한 미셀 주위에는 강한 전기장이 형성된다. 수용액 속의 미셀은 열역학적으로 안정하며, 콜로이드 입자로서 취급된다. 미셀의 안 쪽은 소수성기가 밀집한 영역인데, 계면활성제 미셀 용액에 소수성인 물질이 첨가되면 안쪽의 소수성 부분으로 포집되게 된다. 이때 용액은 투명하여

마치 용해된 것처럼 보이는데, 이같은 현상을 가용화(solubilization)라 한다. 미셀 용액은 입자 크기가 매우 작고 열역학적으로 안정하며 제조하기 쉽고 여과에 의해 멸균될 수 있다는 등의 장점을 가지고 있어 약물전달체와 향장품 등에도 많은 응용 연구가 진행 중에 있다(13).

본 연구에서는 *Phaffia rhodozyma*의 파쇄액에 계면활성제를 첨가해 형성된 미셀 내부에 astaxanthin을 포집, 가용화시켜 추출하는 공정에 대한 연구를 수행하였다. 계면활성제의 종류, pH, 이온강도, 조용매 등 주요공정의 영향과 형성된 미셀의 특성 및 astaxanthin 포집능력 등을 실험을 통해 규명하였다.

재료 및 방법

시 약

본 실험에 사용된 건조된 *Phaffia rhodozyma* 세포는 (주)두성식품으로부터 분무건조된 상태로 제공받았다. Astaxanthin과 β -carotene은 표준품(Sigma, 98% 순도)을 사용하였고, 계면활성제인 Triton X-100, Tween 20은 Sigma에서 구입하였고 SDS는 Bio-Rad에서 구입하였다. 항산화 측정용 위해 사용된 H_2O_2 , peroxidase, *o*-dianisidine은 Sigma에서 구입하였고 TLC (Thin Layer Chromatography) 분석을 위한 TLC aluminium sheet (silica gel 60 F254)는 Merck사에서 구입하였다. 클로로포름, 메탄올 등의 시약은 HPLC급을 사용하였다.

세포파쇄

발효액으로부터 회수한 세포는 high-pressure homogenizer (SLM Instruments, Rochester, USA)를 사용하여 파쇄하였다. *P. rhodozyma* 세포 내 축적된 색소를 추출하기 위해 건조 세포 4 g을 증류수 및 0.1 M의 Tween 20, Triton X-100, SDS 수용액(100 mL)에 넣어 24시간 방치 후 high-pressure homogenizer로 16,000 psi에서 7회 pass시켜 파쇄하였으며 파쇄율은 파쇄시간에 따라 방출되는 carotenoid의 농도를 465 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

총 카르테노이드 함량 측정

색소함량 측정을 위해 UV spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Ultraspec 2000, Uppsala, Sweden)를 이용하였다. 파쇄된 세포액 500 μ L를 채취하고 같은 양의 클로로포름을 첨가한 후 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 한다. 분리된 3개의 층 중에 가장 아래의 크로로포름층은 분취하여 최대흡수파장인 465 nm에서 흡광도를 측정한 후 (A_{465}) 아래 식을 이용하여 계산하였다(14).

$$\text{총 카르테노이드 농도}(\mu\text{g/g-cell}) = (A_{465} \cdot 100 \cdot V) / (E \cdot G)$$

여기서 E는 extinction coefficient($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 2400$)이고 V는 추출된 세포액의 부피(mL)이며 G는 건조된 *P. rhodozyma* 세포 질량(g)이다.

Astaxanthin의 정량분석

Astaxanthin 정량분석에는 C18 컬럼(C18-5B, A04084, 250 \times 4.6 mm, Shodex)이 장착된 RP-HPLC (reverse phase high

pressure liquid chromatography, SLC 100, (주)삼성) 시스템을 이용하였다. UV/VIS spectrophotometer를 사용하였고, 용출액은 100% methanol을 0.7 mL/min의 유량으로 사용하였다. 총 카르테노이드 함량 분석 방법과 동일한 방법에 의해 carotenoids 색소를 추출한 후 0.2 μm 여과지(Milipore)로 여과하고 RP-HPLC를 이용하여 astaxanthin을 정량분석하였다. Sigma에서 구입한 98% astaxanthin 표준품을 여러 농도로 클로로포름에 녹여 농도 대 peak 면적의 표준곡선을 작성한 뒤 astaxanthin의 농도를 결정하였다.

TLC를 이용한 분석

추출물의 총지방 함량과 카르테노이드와 astaxanthin의 조성을 분석하기 위해 TLC(thin layer chromatography)를 이용하였다. 전개용매로 석유에테르 85%, 아세톤 15%를 사용하였고 20% 황산을 사용하여 발색을 유도하였다.

Micelle 형성에 의한 추출

*P. rhodozyma*로부터 astaxanthin의 유기용매 추출법인 클로로포름 추출은 증류수를 용매로 사용하여 세포파쇄액 500 μL 에 100% 클로로포름 500 μL 을 첨가하여 클로로포름층에 추출시켰다. 계면활성제에 의한 *P. rhodozyma*로부터 astaxanthin의 추출은 0.1 M의 Tween 20, Triton X-100, SDS 용액을 용매로 하여 세포파쇄 후 원심분리(13,000 rpm, 10분) 후 미셀이 형성된 상층액을 분취하였다. 이때 미셀의 크기는 DLS(dynamic light scattering, LPA-3000, OTSUKA ELECTRONICS, Japan)로 size 분포를 측정하였다.

Astaxanthin의 항산화력 측정

Colorimetric analysis 법을 변형하여 아래와 같이 실험을 수행하였다(15,16).

이 반응은 H_2O_2 와 peroxidase가 반응하여 H_2O 로부터 $\text{O}\cdot$ 를 떼어내고 $\text{O}\cdot$ 는 DH_2 와 반응하여 H_2O 와 D(dye)를 만들어내는 반응이다. Cuvette에 시료 0.2 mL을 넣고 o-dinisdine 1.4 mL, peroxidase 용액(0.2 U/mL) 0.05 mL을 넣고 25°C에서 3~4분간 평형시켰다. 개시제로 H_2O_2 0.5 mL을 넣고 450 nm에서 적색의 dye를 검출하여 항산화력을 측정하였다.

결과 및 고찰

세포파쇄

고압분쇄기를 사용하여 *P. rhodozyma*의 세포 외벽을 파쇄하였다. 압력은 16,000 psi로 하였고, 7 pass 동안 실험을 수행하면서 각 pass마다 시료를 채취하여 carotenoid의 양을 465 nm에서 측정하였다(Figure 1). 세포파쇄정도는 아래의 식과 같이 나타낼 수 있다(17).

$$Y = (\ln R_m / (R_m - R)) = kP^\alpha$$

여기서, Y는 세포의 파쇄율, R_m 은 카르테노이드 최대 추출량(μg), R은 각각의 pass 후 카르테노이드 추출량(μg)이며, k는 비례상수, P는 pass 횟수, α 는 P의 지수를 나타낸다.

추출된 carotenoid의 농도가 점근선에 도달하는 점이 최적

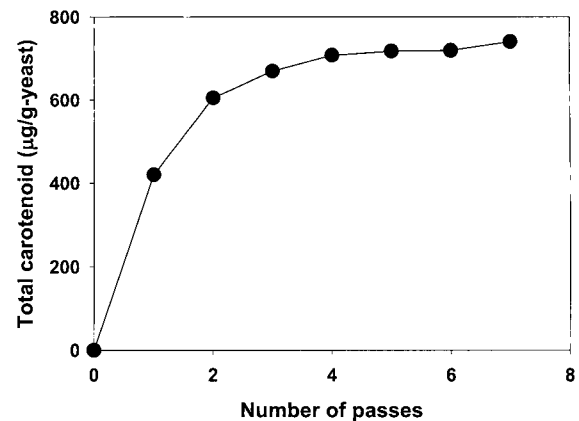


Figure 1. Carotenoid release profile during *P. rhodozyma* disruption by high pressure homogenizer (piston : 1", pressure : 16,000 psi, cell concentration : 4% (4 g/100 mL, yeast cell dry weight/deionized water).

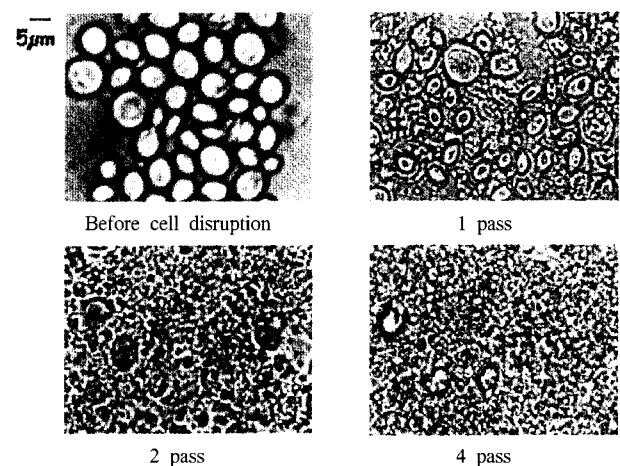


Figure 2. Microscopic pictures of *Phaffia rhodozyma* cells disrupted by high pressure homogenizer ($\times 1000$).

의 pass 횟수라 추정되며 본 실험에서는 4회로 확인되었다(Figure 1). Pass 횟수에 따른 파쇄정도를 광학현미경으로 확인하였을 때 4 pass에서 대부분의 세포들이 파쇄됨을 확인하였다(Figure 2). 따라서 이후의 세포파쇄공정은 4% 세포농도에서 고압분쇄기로 16,000 psi, 4 pass 통과시켜 파쇄하였다.

계면활성제의 종류에 따른 추출효과

유기용매 추출법과 계면활성제 추출법에 따라서 추출된 astaxanthin의 양을 비교하였다. 클로로포름에 의하여 추출하였을 때 astaxanthin의 양은 세포파쇄 후 533 $\mu\text{g/g-yeast}$ 였고, 계면활성제 0.1 M에 의하여 추출하였을 때 Tween 20의 경우 396, Triton X-100의 경우 265, SDS일 때 139 $\mu\text{g/g-yeast}$ 의 추출능을 보였다(Figure 3).

음이온 계면활성제인 SDS의 CMC(Critical micelle concentration) 값(10mM)을 비교하였을 때 Tween 20 (0.06 mM)이나 Triton X-100 (0.22-0.24 mM)에 비해 미셀을 형성할 수 있는 능력이 낮기 때문에 낮은 추출능을 보임을 알 수 있다. Tween 20이나 Triton X-100과 같은 비이온성 계면활성제의 추출능은 그들의 HLB(hydrophilic lipophilic balance)에 달려 있고 값이 클수록 가용화시키는 능력이 커지고 또한 추출능

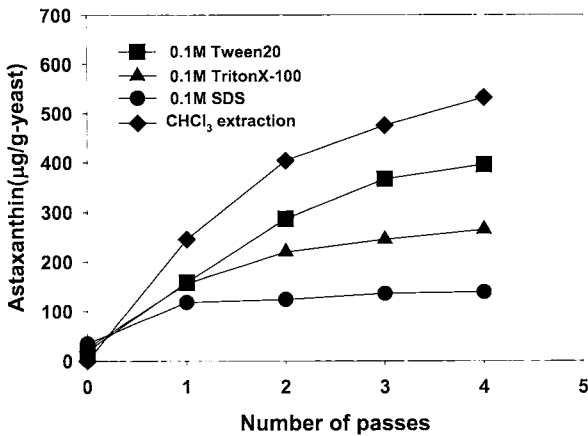


Figure 3. Astaxanthin release profile during *P. rhodozyma* disruption using various surfactants.

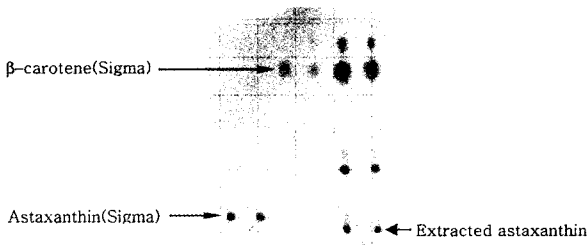


Figure 4. TLC analysis of the crude extract from *P. rhodozyma* (solvent : 85% petroleum ether, 15% acetone, 20% H₂SO₄).

Table 1. Mass concentration of total carotenoids and astaxanthin in the chloroform and Tween 20 extract from *Phaffia rhodozyma* cell homogenate

	CHCl ₃ extract	Tween20 extract
Amount of total carotenoids in extract (mg/g-yeast)	0.708	0.535
Amount of astaxanthin in extract (mg/g-yeast)	0.533	0.396
Amount of astaxanthin(%) in extracted carotenoids	75.3	74
Extraction yield(%)	100	74

이 커진다. Tween 20 (HLB = 16.7)이 Triton X-100 (HLB = 13.5) 보다 HLB 값을 높일 수 있는 ethylene oxide기 (-CH₂CH₂O-) 를 더 많이 가지고 있으므로 높은 추출능을 보이는 것으로 판단된다. 그러나 클로로포름 추출과 Tween 20 미셀에 의한 추출능을 비교하였을 때 추출액 내 카로테노이드 대비 astaxanthin 농도는 74~75%로 비슷하였으나 astaxanthin의 추출수율은 클로로포름 추출 대비 약 74%이므로 보다 높은 추출능을 얻기 위한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다 (Table 1).

TLC를 통하여 미셀 속에 가용화 되어 있는 astaxanthin을 확인한 결과, 추출물 내에 β-carotene 및 astaxanthin을 함유하고 있음을 확인하였다(Figure 4). 추출물에 함유된 astaxanthin 이 표준물질과 R_f value 차이는 미셀에 의한 영향과 고순도로 정제되어 있지 않아서 이거나 생합성 되었기 때문으로 추

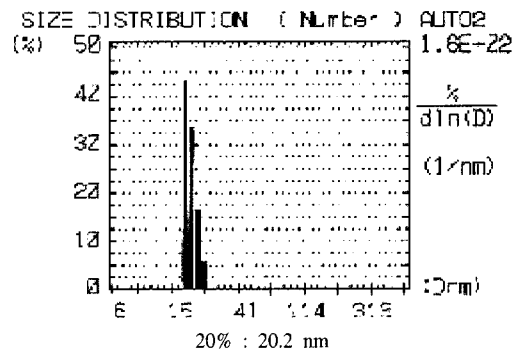
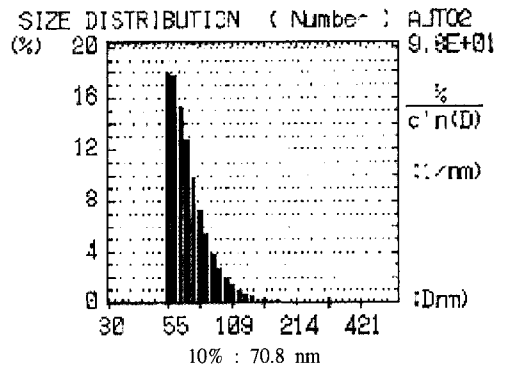
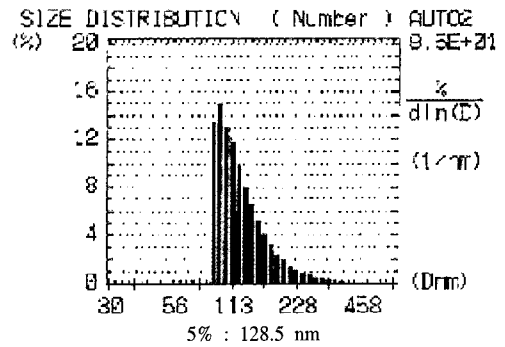


Figure 5. Comparisons of micelle size distribution at various Tween 20 concentrations.

정된다.

Tween 20의 농도에 따른 추출효과

Tween 20의 농도 변화에 따른 추출효과를 알아보기 위해서 농도를 1~20%까지 변화시키면서 추출 실험을 수행하였다. Tween 20의 농도가 1%(9.3 mM)일 때 192, 5%(46.5 mM)일 때 286, 10%(93 mM)일 때 296, 20%일 때 276 µg/g-yeast로 astaxanthin이 추출되어 Tween 20의 농도가 10%일 때 가장 높은 추출량을 보였다. 이때의 미셀의 크기를 DLS(dynamic light scattering) 실험에 의하여 size 분포를 측정하고 미셀의 안정성 및 농도에 따른 경향을 확인하였다. 5%, 10%, 20%일 때 각각 128.5, 70.8, 20.2 nm로 농도가 높을수록 평균 직경이 작아짐을 알 수 있었다(Figure 5). 이는 미셀의 평균 직경이 작아질수록 단위 부피당 미셀의 숫자가 증가하여 astaxanthin의 추출 효과가 증가된 것으로 판단된다.

pH, 이온강도, 조용매의 영향

Tween 20의 농도를 10%(w/v)로 고정하고 pH 및 이온강도

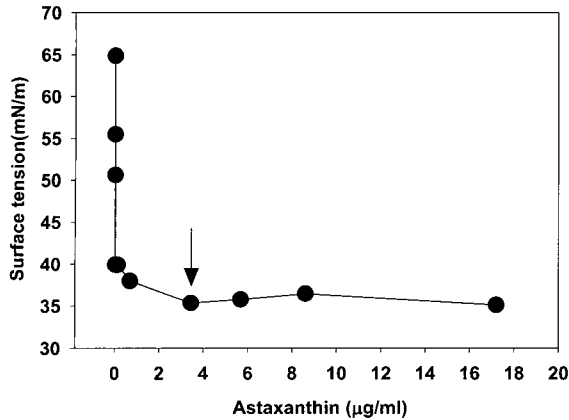


Figure 6. The molar ratio of astaxanthin and tween 20 by surface tension measurement the arrow is CMC(critical micelle concentration).

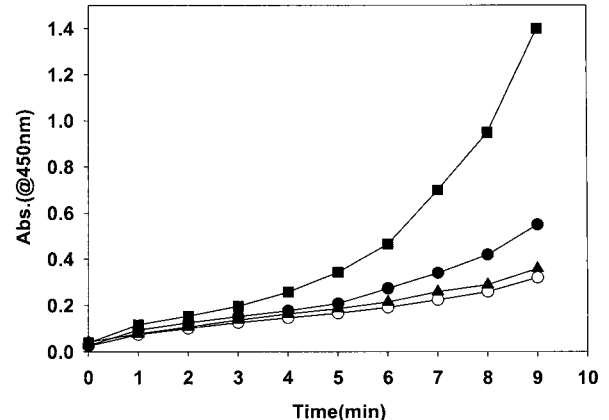
가 미셀 형성에 의한 astaxanthin의 추출능에 미치는 영향을 검토하였다. pH 1일 때 382, pH 3일 때 324, pH 5.3일 때 365, pH 11일 때 386 µg/g-yeast으로 pH는 대체적으로 큰 영향을 미치지 않았다.

또한 이온강도의 변화에 따른 미셀 형성과 astaxanthin 추출능을 보기 위해 NaCl을 첨가하면서 변화를 지켜 보았다. NaCl의 농도가 5 mM일 때 227, 20 mM일 때 220, 40 mM일 때 196, 80 mM일 때 162, 90 mM일 때 138 µg/g-yeast로 astaxanthin이 추출되어, 이온강도가 증가함에 따라서 추출량이 서서히 감소하는 경향을 보였다. 이는 이온강도를 제공하는 Na⁺가 Tween 20의 hydroxyl기와 반응하여 미셀 형성을 저해하기 때문인 것으로 생각된다.

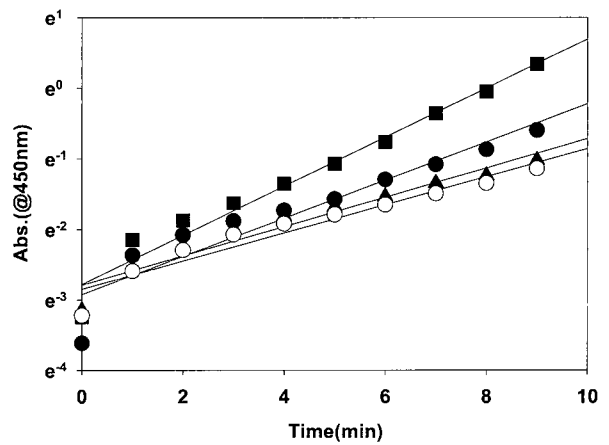
Astaxanthin 추출향상을 위한 조용매로 에탄올을 사용하였다. 에탄올의 양이 증가할수록 astaxanthin의 추출율도 같이 증가하는 경향을 보이다가 Tween 20과 에탄올의 몰비가 9 : 1이 되는 점에서 최대의 추출율을 보였고 이때의 추출율은 클로로포름 추출대비 80%였다. 이 몰비 이후부터는 추출량이 급격히 감소하는 경향을 보였다. 이는 에탄올이 가지는 소수성의 영향으로 에탄올이 미셀 속으로 가용화되어 미셀의 CMC를 낮추기 때문에 추출능이 증가하는 것으로 보여지며, 일정 농도 이상이 되면 에탄올이 Tween 20의 소수성 결합을 방해하여 가용화에 의한 추출능을 감소시키는 것과 일치하는 결과를 보였다(18).

미셀내 Tween과 astaxanthin의 조성

Astaxanthin과 Tween 20의 적정 미셀 농도를 알아보기 위해서 세포파쇄 후의 미셀 용액을 희석시키면서 표면장력을 측정하였다. 용액 내의 계면활성제가 희석되면서 표면장력이 변화하게 되는데 표면장력이 급격히 증가하는 농도가 계면활성제의 CMC가 된다. 초기 astaxanthin의 농도는 17.2 µg/mL 이었고 Tween 20의 농도는 0.1 M이었다. 5배 희석시켰을 때 부터 표면장력의 변화가 보이기 시작하였다. 변화가 보이는 점이 Tween 20의 CMC이고 일반적으로 상온에서 다른 계면활성제가 없을 때 0.06 mM로 알려져 있다. 이 차이는 순수한 Tween 20과 Tween 20 내로 astaxanthin이 가용화되어 일어난 것으로 판단된다. 이때의 astaxanthin의 농도와 Tween 20의 농도로부터 이들의 몰 비율을 계산하면 astaxanthin 대



(a)



(b)

Figure 7. Comparison of antioxidant activity by colorimetric analysis (■ : control, ○ : 0.03 mM astaxanthin, ▲ : 0.03 mM β-carotene, ● : 0.03 mM α-tocopherol)

Tween 20의 몰 비율은 약 1 : 12로 판단된다(Figure 6).

항산화력 평가

Colorimetric analysis법에 의하여 astaxanthin의 항산화력을 같은 carotenoid류인 β-carotene과 기준에 항산화제로 널리 쓰이는 α-tocopherol과 비교하였다. Astaxanthin의 농도가 높을수록 용매 속의 산소 라디칼과 빨리 반응하여 peroxidase와 산소 라디칼과의 반응을 저해하는 경향을 보였다. 따라서 80 µg/mL까지는 astaxanthin의 농도에 비해 항산화력이 선형적으로 증가하였다. 이는 astaxanthin의 항산화력이 이 농도까지 유지됨을 나타내고 있다. Astaxanthin의 항산화력은 흡광도가 증가하는 속도로 볼 때 β-carotene과 α-tocopherol보다 높은 것으로 확인되었다(19)(Figure 7(a)).

과산화수소에 의한 산화반응을 1차반응으로 가정하였을 때 astaxanthin, β-carotene 그리고 α-tocopherol의 항산화력을 비교하였다. 반응속도 상수는 항산화제를 첨가하지 않았을 때 0.347 min⁻¹, α-tocopherol을 첨가한 것은 0.269 min⁻¹, β-carotene을 첨가한 것은 0.207 min⁻¹, astaxanthin을 첨가한 것은 0.190 min⁻¹으로서 astaxanthin이 산화반응을 약 1.8배 억제시키는 것으로 나타났다. 또한 astaxanthin은 α-tocopherol 대비 약 1.4배 높은 항산화력을 보여주었고 β-carotene과는 항

산화력의 차이가 거의 없었다(Figure 7(b)). 이미 보고된 항산화 능력과 비교하여 보면 본 연구에서 추출된 astaxanthin의 항산화능이 다소 떨어짐이 확인되었다(19). 이는 미셀내에 포집된 물질이 astaxanthin 이외의 다른 불순물이 존재 하여 저해 가능성을 시사하여 준다.

결론

분무 건조된 *P. rhodozyma* 세포를 계면활성제 용액에 swelling시킨 후 고압분쇄기를 사용하여 세포벽을 파쇄한 후 계면활성제의 미셀 형성에 의해 친유성이 높은 astaxanthin을 가용화하여 추출하는 실험을 수행하였다. 3 종류의 계면활성제 중에서 Tween 20의 HLB값이 가장 높고 이에 따라 가용화되어 추출된 astaxanthin의 양도 가장 높았다. Tween 20의 농도는 5~20%에서 거의 차이를 볼 수 없었다. 용액 내 미셀 크기를 DLS에 의하여 분석한 결과 계면활성제의 농도가 높아질수록 평균직경이 작아짐을 관찰하였다. 추출된 astaxanthin의 양은 차이가 거의 없었으나 astaxanthin공정생산성 및 경제성을 고려할 때 10%(w/v) 수준이 적절한 것으로 사료되었다.

Tween 20 미셀내부의 astaxanthin과 Tween 20과의 몰비를 표면장력을 측정하여 계산한 결과 약 1 : 12였다. Astaxanthin의 추출율을 클로로포름 추출과 비교하였다. 추출물 내의 carotenoid와 astaxanthin의 비율은 거의 비슷하였으나 추출된 절대량을 비교할 때 CHCl₃ 추출의 74% 정도였다. Astaxanthin의 추출율을 높이기 위해서 pH, 이온강도의 변화를 주었고 또한 co-solvent로서 에탄올을 사용하였다. pH 1~11 범위에서 추출능의 아무런 변화를 볼 수 없었다. NaCl을 이용한 이온강도의 영향은 이온강도가 높을수록 가용화율이 감소하는 비이온 계면활성제에서의 전형적인 경향을 보였다. 에탄올의 양이 증가할수록 astaxanthin의 추출율도 같이 증가하는 경향을 보이다가 Tween 20과 에탄올의 몰비가 9 : 1이 되는 점에서 최대의 추출율을 보였고 이때의 추출율은 클로로포름 추출대비 80% 수준이었다. 그 이후부터는 급격히 감소하는 경향을 보였다.

Micelle에 의해 추출된 astaxanthin의 항산화력은 약 80 µg/mL 까지 astaxanthin의 농도에 비례하였고, α-tocopherol 대비 약 1.4배 높은 항산화력을 보여주었으며 β-carotene과는 거의 차이가 없었다.

이 실험을 통하여 확인된 조건들은 astaxanthin의 환경친화적인 정밀 분리정제공정의 기초자료로 이용될 것으로 기대된다.

감사

본 연구는 1999년 한양대학교 교내연구비 지원으로 수행되었으며, 초정밀생물분리기술연구센터(ERC)의 연구지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Wataru, M. (1991), Biological function and activities of

- animal carotenoid, *Pure & Appl. Chem.*, **63**, 141-146.
- Tera J. (1989), Antioxidant Activity of β-Carotene-Related Carotenoids in Solution, *Lipids*, **24**(7), 659-661.
- Bendich A. (1989), Carotenoids and the Immune system in carotenoids, pp 323-335 *Plenum press, New York*.
- Andrewes, A. G., H. J. Phaff, and M. P. Starr (1976), Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast, *Phytochemistry*, **15**, 1003-1007.
- Sies, H. (1985) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Academic Press, New York.
- Lim, D. T., and E. K. Lee (2000), Fermentation Process Characteristics of *Phaffia rhodozyma* Mutant B76 for Astaxanthin Biosynthesis. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(2), 125-133.
- Nelis, H. J. and A. P. De Leenheer (1991), Microbial sources of Carotenoid pigments used in foods and feeds, *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 181-191.
- Droop, M. R. (1955), Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis*, *Nature*, **175**, 42.
- Tjahjono, A. E., T. Kakizono, Y. Hayama, N. Nishio and S. Nagai (1994), Isolation of Resistant Mutants against Carotenoid Biosynthesis Inhibitors for a Green Algae *Haematococcus pluvialis*, and their Hybrid Formation by Protoplast Fusion for Breeding of higher Astaxanthin Producers, *J. Ferment. Bioeng.* **77**, 352-357.
- Harker, M., A. J. Tsavalos and A. J. Young (1996), Autotrophic Growth and Carotenoid Production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 Liter Air-Lift Photobio reactor, *J. Ferment. Bioeng.* **82**, 113-118.
- Hard, N. F (1988), Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses, *Biotech. Letters*, **10**(9), 609-614.
- Barth, M. M., C. Zhou, K. M. Kute, and G. A. Rosenthal (1995), Determination of Optimum Conditions for Supercritical Fluid Extraction of Carotenoids from Carrot(*Daucus carota* L.) Tissue, *J. Agric. Food Chem.* **43**, 2876-2878.
- Bhargava, H.N., Narurkar, A., and Lieb, L.M. (1987), Using microemulsions for drug delivery. *Pharm. Technol.* March. 46
- Davies B. H. (1976), Carotenoids, In Chemistry and Biochemistry of Plant Pigment, Vol. 2 T. W. Goodwin Ed., p 38-165 Academic Press, Inc. Ltd., London.
- Jun, B. O., (1996), Effects of Dimethin on the Senescence of Excised Barley First Leaves. *Kor. J. Bot.* **33**(1), 25-30.
- Bernt, E. and H. U. Bergmeyer. (1974), Inorganic peroxidases, In *Method of Enzymatic Analysis*, Vol. 4, H. U. Bergmeyer, Ed., p 2246-2248 Academic Press, New York.
- Hetherington, P. J., Fellow, M., Dunnill, P., Lilly, and M. D. (1971), *Trans. Industn. Chem. Eng.* **49**, 347.
- Chung, J. J., S. H. Lee., Y. C. Kim, and B. H. Lee (1998) Effects of Salts and Isomeric Butanols on the Mixed Micellar Properties of Cetylpyridinium Chloride with Triton X-100. *J. Kor. Ind. & Eng. Chemistry.* **9**(7), 968-973.
- Kobayashi M., T. Kakizono, N. Nishio, S. Nagai, Y. Kurimura, and Y. Tsuji (1997) Antioxidant role of astaxanthin in the green algae *Haematococcus pluvialis*., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 351-356.