

효소 처리에 의한 Astaxanthin의 추출 효율 향상

인만진* · 최지혜 · 김소영¹ · 채희정¹ · 김동호²

청운대학교 식품영양학과, ¹호서대학교 식품생물공학과, ²에프엔바이오(주)

Enhanced Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using Enzyme Treatments

Man-Jin In*, Ji-Hye Choi, Soyoung Kim¹, Hee Jeong Chae¹ and Dong Ho Kim²

Department of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongseong 350-701, Korea

¹Department of Food and Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

²FNBio Co. Ltd, Boryeong 355-811, Korea

Received August 5, 2008; Accepted September 8, 2008

Key words: astaxanthin, enzyme treatment, extraction, *Haematococcus pluvialis*

연어, 송어 또는 갑각류 등의 해양 생물과 조류에 존재하는 주황색 혹은 붉은색 색소 성분인 astaxanthin(3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione)은 ketocarotenoid로 polyisoprenoid와 benzenoid ring의 결합체이며 면역증강, 항암, 시력 보호 등 여러 가지 기능성 뿐만 아니라 vitamin C나 α -tocopherol보다 500-1000배의 항산화 효과가 입증되어 의약품, 화장품, 식품, 사료 등의 첨가물로 활용이 기대되고 있는 물질이다.^{1,2)} Astaxanthin을 제조하는 방법은 화학적 합성법, 갑각류 껍질로부터 추출법, 붉은 효모(*Phaffia rhodozyma*)와 미세조류(*Haematococcus pluvialis*)를 배양한 후 추출하는 방법이 있다.³⁾ 화학적으로 합성된 astaxanthin은 생체 이용률과 안정성이 낮으며, 게나 새우 껍질에서 추출된 astaxanthin은 추출은 용이하나 회분과 키틴 함량이 높아 사용상의 제한이 있다. 또한 *P. rhodozyma*는 astaxanthin 생산량이 적으며 생체 이용률이 낮은 3R, 3'R form만을 생산하므로 사료용으로만 사용되고 있다. *H. pluvialis*는 현재까지 가장 효율적인 astaxanthin의 생산원료로, astaxanthin 함량이 1.5~3% 수준으로 다른 공급원에 비해 높고, 생체 내에서 안정성이 우수하고 생체 이용률이 높은 3S, 3'S form를 생산하는 장점이 있다.^{4,5)} *H. pluvialis* 균체로부터

astaxanthin을 얻는 방법은 유기용매 추출법^{6,7)}과 초임계 CO₂로 추출하는 방법^{8,9)}이 이용되고 있다. 초임계 추출법은 추출 효율이 높으나 특별한 장비가 필요하며, 유기용매 추출법에서 식품 첨가물로 사용할 수 있는 용매는 주정(95% ethanol)과 acetone이므로 추출 효율이 낮은 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 용매추출법으로 식품용 astaxanthin 제조시 추출 효율을 향상시키기 위하여 *H. pluvialis* 균체에 대한 복합 다당류 분해효소와 단백질 분해효소 처리 효과를 조사하였다.

실험에 사용한 *H. pluvialis* 균체는 Parry Nutraceutical사(Oonaiyur, India)의 제품이었으며, 상업용 복합 다당류 분해효소와 단백질 분해효소는 대부분 Novozyme사(Bagsvaerd, Denmark)에서, Collupulin는 DSM Corp.(Heerlen, Netherlands)로부터 구입하였다. *H. pluvialis* 균체 분말 0.5 g을 증류수 40 ml에 현탁한 후, 0.1 N NaOH 또는 HCl로 현탁액의 pH를 각 효소의 반응 최적 pH로 조절하고 복합 다당류 분해효소 또는 단백질 분해효소를 0.02 g 첨가하였다. 효소를 첨가한 현탁액을 50°C에서 2시간 동안 진탕 반응시킨 후 3000×g로 10분간 원심분리하여 얻은 침전물을 추출에 사용하였다. 침전물에 acetone 100 ml를 가한 후 초음파처리(75 min, 40 kHz; Power sonic 510, Hwashin, Korea)하여 astaxanthin을 1회 추출하였다. 추출액 중 astaxanthin의 함량은 C18 column과 UV 검출기(474 nm)를 사용하여 HPLC로 분석하였다.¹⁰⁾ 동시에 효소처리 후 원심분리로 얻은 침전물을 동결건조하여 고형분 회수율을 계산하였다.¹¹⁾

녹색 단세포 조류 중 하나인 *H. pluvialis*는 정상적인 환경에서는 녹색의 영양세포로 성장하나 영양분, 온도, 빛 등과 같은 외부 환경 변화에 의한 비정상적인 조건에서는 녹색 영양세포의 세포벽이 매우 두꺼워지며 세포내 astaxanthin을 다량 축적하여 적색의 포낭세포(red cyst cell)로 전환되어 휴면 단계로 전환되는 것으로 알려져 있다.¹²⁾ *H. pluvialis* 세포로부터 astaxanthin 추출에 적합한 복합 다당류 분해효소와 단백질 분해효소를 각각 선별하였다. *H. pluvialis* 균체 현탁액에 상업용 효소를 처리하고 원심분리로 상등액을 제거한 후 침전물을 acetone으로 추출하여 astaxanthin 함량을 분석하였다. 효소처리로 *H. pluvialis* 균체에서 지용성의 astaxanthin 보다 다량의 수용성 성분이 제거될 것으로 예상되므로 효소처리 후 고형분 회수율이 낮으며 *H. pluvialis* 균체 단위 무게에서 많은 양의 astaxanthin을 추출할 수 있는 Viscozyme과 Alcalase를 선별하였다(Table 1). 이때 효소를 사용하지 않은 대조구의 고형분 회수율은 79.79%, astaxanthin content는 522.90 $\mu\text{g/g}$ 이었다. Viscozyme과 Alcalase를 처리함으로써 *H. pluvialis* 균체에서 용매추출로 얻을 수 있는 astaxanthin의 양이 3배 이상 향상되었다. *Aspergillus aculeatus* 기원의 Viscozyme은 arabanase, cellulose, hemicellulase, xylanase, β -glucanase를 함유한 multi-enzyme complex로 포낭세포의 단단한 세포벽을 효과적으로 분해하는 것으로 판단된다. 또한 단백질 분해효소인 Alcalase는 *H. pluvialis* 세포벽에 존재하는 것으로 알려진¹³⁾ 163종의 단백질에 작용하여 세포벽의 분해에 기여하는 것으로 사료된다.

*Corresponding author

Phone: +82-41-630-3278; Fax: +82-41-632-3278

E-mail: manjin@chungwoon.ac.kr

Table 1. Effect of various enzyme treatments on the extraction of astaxanthin from *H. pluvialis*

Commercial name	Optimum conditions		Solid recovery (%)	Astaxanthin content (µg/g)
	pH	Temp. (°C)		
Pectinex	4.5	50	74.42	621.41
Tunicase	8.0	50	70.04	671.82
Ultraflo	7.5	50	75.26	782.37
Viscozyme	4.5	50	65.87	1565.33
Alcalase	7.5	50	63.19	1799.51
Collupulin	6.0	50	77.71	746.26
Esperase	7.5	50	71.86	964.10
Flavourzyme	6.0	50	73.67	1109.22
Kojizyme	6.0	50	73.75	1343.20
Nutrase	6.0	50	67.71	885.81
Protamex	6.0	50	68.07	1223.70

Table 2. Effect of enzyme treatment methods on extraction of astaxanthin from *H. pluvialis*

Treatment	Reaction conditions	Solid recovery ¹⁾ (%)	Astaxanthin content ¹⁾ (µg/g)
No treatment	50°C, 2hr	80.81±0.72	521±12
Viscozyme	pH 4.5, 50°C, 2hr	74.32±0.68	1523±43
Alcalase	pH 7.5, 50°C, 2hr	65.44±0.45	1776±24
Viscozyme	pH 4.5, 50°C, 2hr	56.62±1.01	2649±359
↓	↓		
Alcalase	pH 7.5, 50°C, 2hr	51.52±0.62	1986±70
Alcalase	pH 7.5, 50°C, 2hr		
↓	↓		
Viscozyme	pH 4.5, 50°C, 2hr		

¹⁾Data are shown as means±SD (n=3).

Viscozyme과 Alcalase의 사용량에 따른 astaxanthin content의 변화를 각각 조사한 결과 *H. pluvialis* 균체량의 4%(w/w) 이상의 조건에서는 효소량이 증가하여도 거의 일정한 결과를 나타내었다(데이터 제시는 생략함). 따라서 Viscozyme과 Alcalase의 사용량은 4%가 적당하였다. 본 연구 결과는 기존의 클로렐라¹¹⁾나 스피르ulina¹⁴⁾의 세포벽 분해조건보다 효소 사용량이 증가한 것으로 이는 각 미세조류 세포벽의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

복합 다당류 분해효소와 단백질 분해효소의 처리 순서를 최적화하기 위하여 *H. pluvialis* 균체 현탁액에 선별한 효소를 처리하였다. Viscozyme과 Alcalase는 반응 최적 pH가 매우 상이하므로 두 효소를 동시에 처리하는 것은 곤란하다. 따라서 2단 순차적 반응으로 Viscozyme→Alcalase의 순서로 또한 그 역으로 *H. pluvialis* 균체에 반응시켰다. 대조구로 효소를 사용하지 않은 조건과 Viscozyme과 Alcalase를 각각 사용한 조건을 포함하여 효소처리 조건에 따른 고형분 회수율과 astaxanthin content를 Table 2에 정리하였다. 효소처리 후 용매로 추출하는 것이 매우 효과적이었으며, Viscozyme과 Alcalase를 단독으로 사용하는 것보다 두 종류의 효소를 모두 처리하며 처리 순서는 Viscozyme을 처리한 후 Alcalase를 사용하는 것이 가장 효과적이었다. Viscozyme→Alcalase 순서로 효소처리 후 acetone으로 추출한 경우 효소를 사용하지 않은 대조군보다 astaxanthin content가 400%(521 µg/g→2,649 µg/g) 이상 증가하였다. 또한 세포벽 분해활성을 갖고 있는 Viscozyme만을 사용한 결과보다도 astaxanthin content가 70%(1,523 µg/g→2,649 µg/g) 이상

증가하였다. Astaxanthin의 추출효율을 향상시키기 위하여 *H. pluvialis* 포낭세포의 세포벽을 세포벽 분해효소로 처리하는 결과가 보고¹⁵⁾되어 있으나, 본 연구에서는 단백질 분해효소를 추가로 처리하면 추출효율이 더욱 향상되는 것으로 조사되었다. 이상의 결과는 단백질 분해효소를 포함하여 작용 기작이 상이한 두 종류의 효소를 *H. pluvialis*와 유사한 미세조류에 처리하여 분해 효율을 향상시킨 보고^{11,14)}와 유사한 결과이다. *H. pluvialis* 세포가 astaxanthin을 1.5~3%(w/w) 수준으로 축적한다는 보고^{5,9)}를 기준하면 본 연구에서 Viscozyme, Alcalase의 순서로 효소처리한 경우 astaxanthin 추출 수율은 9~18% 정도로 낮다. 그러나 이상의 결과는 효소처리의 효과를 확인하기 위하여 효소처리 후 acetone으로 1회 추출한 결과이므로 추후 acetone을 사용한 추출조건에 관한 보완적인 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 2007년도 중소기업청 산학연 공동기술개발 컨소시엄 사업의 지원을 받아 수행한 결과의 일부입니다.

참고문헌

- Guerin, M., Huntley, M. E. and Olaizola, M. (2003) *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* **21**, 210-216.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S., Kurimura, Y. and Tsuji, Y. (1997) Antioxidant role of astaxanthin in the

- green alage *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 351-356.
3. Higuera-Ciapara, I., Felix-Vanlenzuela, L. and Goycoolea, F. M. (2006) Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **46**, 185-196.
 4. Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A. and Abalde, J. (2005) Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technol.* **96**, 373-378.
 5. Park, E. -K., Seo, M.-W. and Lee, C. -G. (2001) Effects of medium compositions for the growth and the astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 227-233.
 6. Boussiba, S., Fan, L. and Vonshak, A. (1992) Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green algae *Haematococcus pluvialis*. *Methods Enzymol.* **213**, 386-391.
 7. Kang, C. D. and Sim, S. J. (2007) Selective extraction of free astaxanthin from *Haematococcus* culture using a tandem organic solvent system. *Biotechnol. Prog.* **23**, 866-871.
 8. Valderrama, J. O., Perrut, M. and Majewski, W. (2003) Extraction of astaxanthin and phycocyanine from microalgae with supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Data* **48**, 827-830.
 9. Machmudah, S., Shotipruk, A., Goto, M., Sasaki, M. and Horose, T. (2006) Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using supercritical CO₂ and ethanol entrainer. *Ind. Eng. Chem. Res.* **45**, 3652-3657.
 10. Kim, S., Cho, E., In, M. -J. and Chae, H. J. (2008) Extraction and analysis conditions of astaxanthin from *Haematococcus*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, in press.
 11. In, M. -J., Jang, J. E. and Kim, D. H. (2007) Enhancing extraction yield of chlorella extract by enzyme treatment. *J. Appl. Biol. Chem.* **50**, 132-135.
 12. Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N. and Tsuji, Y. (1997) Morphological changes in the life cycle of the green algae *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* **84**, 94-97.
 13. Wang, S. -B., Hu, Q., Sommerfield, M. and Chen, F. (2004) Cell wall proteomices of the green algae *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*). *Proteomices* **4**, 692-708.
 14. In, M. -J., Gwon, S. Y., Chae, H. J., Kim, D. C. and Kim D. H. (2007) Production of spirulina extract by enzymatic hydrolysis. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**, 304-307.
 15. Kobayashi, M., Kurimura, Y., Sakamoto, Y. and Tsuji, Y. (1997) Selective extraction of astaxanthin and chlorophyll from the green algae *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Tech.* **11**, 657-660.