

연구논문

# *Haematococcus pluvialis* 유래 아스타잔틴의 리포솜 캡슐화가 코스메슈티컬 소재로서의 안정성에 미치는 영향

이정현, 김동명<sup>1</sup>, 변상요\*

## Effect of Liposomal Encapsulation of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* on Stabilities for Cosmeceuticals

Chung Hyun Lee, Dong-Myung Kim<sup>1</sup>, and Sang Yo Byun\*

접수: 2011년 9월 15일 / 게재승인: 2011년 10월 12일  
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Studies were made to improve the stability of astaxanthin which has application limitations caused by light and thermal stability problems in spite of its strong anti-oxidant property. Astaxanthin was extracted from *Haematococcus pluvialis* with supercritical carbon dioxide. Liposomal encapsulation of astaxanthin to improve the stability was made with high pressure homogenizer. The narrow size distribution was observed with astaxanthin liposomes. Tests on light and thermal stabilities resulted that the liposomal encapsulation improved the stability of astaxanthin for cosmeceutical purposes.

**Keywords:** astaxanthin, liposome, encapsulation, *Haematococcus pluvialis*

### 1. 서론

최근 차세대 항산화 성분인 아스타잔틴 (Astaxanthin)이 식품, 의약품, 화장품 등 바이오산업 전반에서 큰 주목을 받고 있다. 아스타잔틴은 자연계에 널리 존재하는 keto-carotenoid로

polyisoprenoid와 oxygen quenching 기능을 가진 benzenoid ring의 결합체이다 [1-6]. 카로테노이드는 lipid-soluble하며, 주황색 또는 붉은색을 띠는 색소로 자연계에 700여종이 존재한다. 주로 새우, 붉은 도미류, 연어 및 바다가재등과 같은 해양 동물 조직에 존재하는 것으로 알려져 있다 [10-12].

아스타잔틴의 화학명은 3,3'-dihydroxy-β-β-carotene-4,4'-dione.으로 가장 널리 알려진 카로티노이드류 중 비타민 A의 전구체인 베타카로틴을 기본 화학구조로 한 카로티노이드이며, 화학적으로 크산토펜로 분류된다. 아스타잔틴은 말단기에 가지고 있는 히드록시 (OH)기와 케톤 (=C-O)기는 강력한 항산화능력이 있고, 친수기와 친유기가 있는 이중층계면에서 아스타잔틴의 극성부분의 회전은 프리라디칼을 공격이 일어나게 한다. 자연산과 합성의 아스타잔틴 화학적 특성은 공간에서의 입체화학적특성 (이성질체)에 기인한다. 아스타잔틴은 3S-3'S, 3R-3'S, and 3-3R으로 존재하는데 키랄탄소 내의 히드록시기 (OH)의 3차원적 배향에 기인한다. 이런 chirality와 stereoisomers 차이는 효소, 면역성차이를 가져오며, 약, 향료, 향신료와 음식첨가제등과 같은 bioactive같은 경우에 매우 중요하다. 헤마토코쿠스 프로비알리스 같은 해양 미생물, 연어, 게 등의 자연산 아스타잔틴은 3S-3'S형태이지만, 석유화학 같은 합성 아스타잔틴은 3R-3'S (the meso form)가 50%로 함유된 혼합형태이다.

아스타잔틴의 가장 주요한 기능은 항산화력으로 [13], 종전에 널리 사용되었던 다른 카로테노이드의 10배 이상이고, α-토코페롤 (tocopherol)의 100배 이상인 것으로 보고되었으며 [14] 항산화제의 보석 (The jewel antioxidant) 이라 불리고 있다. 또한 현재까지 아스타잔틴의 독성에 대해서는 보고된 바 없다. 아스타잔틴은 정상적인 호기적 대사과정 중 활성

아주대학교 대학원 응용생명공학과 화장품과학전공  
Cosmetic Science Major, Applied Biotechnology Department,  
Graduate School, Ajou University, Suwon 443-749, Korea  
Tel : +82-31-219-2451, Fax : +82-31-219-1610  
e-mail: sybyun@ajou.ac.kr

<sup>1</sup>한국콜마(주) 피부과학연구소  
<sup>1</sup>R&D Center, Kolmar Korea

산소가 세포 내 DNA, 단백질, 지질 등을 손상시키는 것보다 더불어 세포와 조직의 노화 및 발암을 유발하는 반응을 억제할 뿐만 아니라 유리 라디칼의 생성을 억제하는 작용을 한다 [15-16]. 화장품 소재로서는 레티놀 전구체로서 주름개선 [9]에 효과적이며, 티로시나제 억제에 의한 멜라닌 색소 침착 억제 [9] 피부보습 [8] 가려움 습진 개선 효과, 자외선에 의한 유해산소 제거효과 [17], 피부탄력 개선 [9] 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 하지만 단가와 안정성, 원료 수급에 문제가 있고 추출하는 방법에서도 안정성, 색상, 수율, 품질에 제약이 많이 따르며, 폐기물 처리도 어려움이 있다. 그중에서도 열, 광에 의하여 쉽게 변화하는 등의 취급에 어려움과 분자량이 매우 커 이용에도 여러 가지 난제가 있다.

아스타잔틴을 생합성하여 세포내에 축적하는 균주로부터 효과적으로 회수하기 위하여 세포벽을 파괴하여 추출하는 다양한 방법들이 소개되고 있다 [18]. 프렌치프레스 (French pressure), 호모게나이저 (Braun homogenizer), 균질기 (Microfluidizer)와 같은 기계를 이용하여 물리적으로 세포벽을 파괴하는 방법 및 세포벽을 분해하는 효소를 이용하는 방법 [19], 에틸 알콜, 아세톤 등의 유기용매로부터 아스타잔틴을 추출하는 방법도 보고된 바 있다 [20].

아스타잔틴은 다양한 기능을 가지고 있으나 가장 큰 문제점은 고온안정성, 열안정성이 나쁜점, 분자량이 커 사용의 어려움, 색상 문제, 고단가등의 문제점이 있다. 따라서 본 연구에서는 *Haematococcus pluvialis*를 이용하여 순도와 효율성을 증진하기 위해 co-solvent를 사용하지 않고 초임계추출법으로 추출하였고, 추출된 아스타잔틴의 안정성을 높이고자 하였다. 이렇게 추출 획득한 아스타잔틴은 열, 광에 약해 취급이 어려워 이를 해소하기 위하여 리포솜 캡슐화 과정을 거쳐 나노 베지클에 담지하여 안정성을 향상시켜 화장품 소재로서의 효능을 증진시키고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 재료

실험에 사용한 아스타잔틴 추출원료인 *Haematococcus pluvialis*는 중국의 Honghao chemicals로부터 구입하여 빛이 차단된 조건에서 냉장 보관하여 사용하였으며 초임계 추출에 사용한 용매로는 순도 99.99%의 순도를 갖는 식품용 이산화탄소를 사용하였다. 그 밖의 모든 시약은 1급 또는 HPLC급 시약을 사용하였다.

### 2.2. 초임계 이산화탄소 추출

아스타잔틴 추출을 위한 초임계 추출 장치 및 흐름도는 Fig. 1과 같다. 액체 상태의 이산화탄소를 pump로 가압하고 BPR로 반응기 내부의 압력을 조절하였다. 봉입 대상 물질의 온도, 압력, 입자 크기에 따른 용해도를 알아보기 위해 초임계 추출하였다. 초임계 추출장치는 추출기에 원료인 *Haematococcus pluvialis*를 충전하고, 열 교환기를 통하여 액화시킨 초임계 이산화탄소를 추출기의 하단부에 공급한다. 이렇게 공급된 초임계 이산화탄소는 충전된 원료 물질과 접촉하여 아스타

잔틴을 추출하여 상승한 뒤 추출기 밖으로 방출되는데, 추출된 초임계 이산화탄소와 아스타잔틴의 혼합물은 감압밸브를 경유하며 감압되면서 감압기로 이송된다. 감압기에서는 추출된 아스타잔틴과 이산화탄소가 분리되며, 분리된 이산화탄소는 열교환기를 통하여 액화된 후 저장조로 순환되어 재사용되며, 감압기에서 분리된 아스타잔틴은 최종 제품으로 수거된다. 이산화탄소 저장조에서 순환되어 공급되는 이산화탄소 외에 전 공정에서 발생하는 약간의 손실을 보충하도록 외부에서 이산화탄소가 보충될 수 있다. 저장조에 저장된 이산화탄소는 펌프를 통하여 가압되어 초임계 상태로 열교환기를 통하여 다시 추출기에 공급된다. 본 실험에서는 초임계 유체 추출을 이용하여 *Haematococcus pluvialis*로부터 아스타잔틴을 추출하였으며 압력은 250, 300, 350 bar, 온도를 50, 60, 70°C, 입자 크기 조건별로 변화시키면서 추출을 실시하였다.

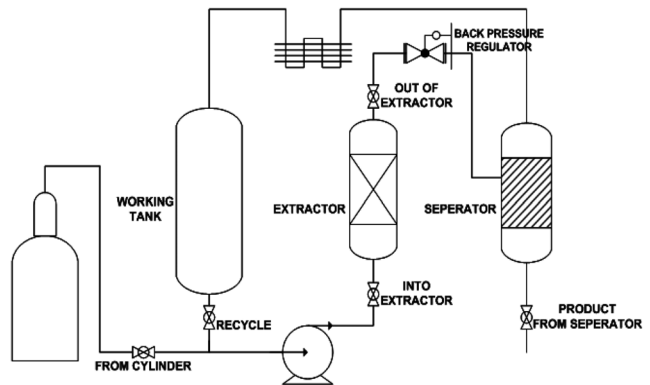


Fig. 1. Process flow diagram for the supercritical fluid extraction.

### 2.3. 리포솜 캡슐화

High pressure homogenizer는 입자의 균질화 및 맛 개선과 보관 기간을 연장 할 목적으로 만들었으며 유제품 및 식품 가공에 널리 사용되고 있고 화학 공업에서도 많이 응용되고 있다. Homogenizer는 높은 압력에서 시료를 valve사이 간격을 통과시켜 고압에서 상압으로 변환시키면 압력차에 의한 cavitation과 난류에 의해 입자의 미립화가 일어난다. 입자 크기는 약 1 μm 이하를 필요로 할 때 homogenizer를 사용하며 압력을 발생 시키는 가압 부분과 효과를 얻기 위한 valve 부분으로 구성되어 있다. 3wt% Lecithin에 10wt% Propylene glycol, 2wt% Mineral oil, 10wt% EtOH을 혼합 후 65~70°C로 가온하여 용해시킨 후 증류수를 첨가한 혼합물을 Homomixer를 이용하여 3500 rpm에서 10분간 균질화하여 1차 리포솜을 제조하였다. 제조한 리포솜에 Astaxanthin 1wt%를 넣은 후 5분간 다시 균질화하고 고압 Homogenizer를 이용하여 1000 bar에서 3회 통과하여 리포솜을 제조하였다.

### 2.4. 리포솜의 특성 및 안정성 측정

제조된 리포솜의 입자 크기 분포는 입도분포 측정기 (Mastersizer, Malvern, UK)를 이용하여 측정하였다. 일정 파장의 Laser가 입자의 표면에 조사되면 나타나는 회절 (Diffraction), 굴절 (Refraction), 반사 (Reflection)의 동시

복합적 현상을 이용하며, 산란강도는 입자의 크기에 비례하고 산란각은 입자 크기에 반비례한다는 원리로 입자 크기를 분석하는 장비이다. 아스타잔틴의 광 및 열 안정성 측정을 위하여 아스타잔틴 emulsion과 리포좀 용액을 이용하였다. 광 안정성은 샘플을 일광 조건에서 방치 1, 3, 6일 후 상등액을 취하여 색도 변화를 측정하였다. 열 안정성은 동일 샘플을 이용하여 45, 37, 25, 4°C에서 각 6시간으로 총합 24시간이 1 cycle로 고정하고 cycle test를 실시하여 광 안정성과 마찬가지로 1, 3, 6일 후 상등액을 취하여 색도 변화를 측정하였다. 색도는 Color Spectrophotometer (Color Mate, Scinco, Korea)를 이용하여 ΔE 값을 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 초임계 이산화탄소를 이용한 아스타잔틴 추출

일반적으로 초임계 유체 추출에 있어 그 추출물의 함량 및 조성은 초임계 이산화탄소의 추출 온도, 압력 및 추출물의 입자 크기에 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 초임계 이산화탄소 추출을 이용하여 *Haematococcus pluvialis*로부터 수율이 높은 아스타잔틴을 얻기 위해서 우선적으로 초임계 이산화탄소의 추출 온도 및 압력을 단계별로 조절하여 추출을 실시하였다. 초임계 추출 조건에 따른 추출물의 수율은 아래 Fig. 2-4와 같다.

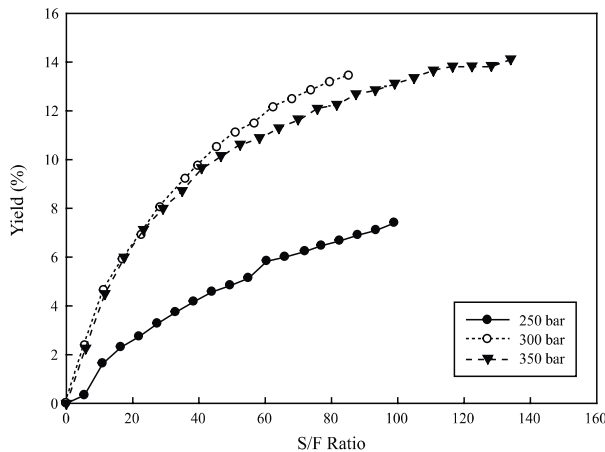


Fig. 2. Yield of extracted material vs. extraction pressure.

압력은 초임계 추출의 중요한 변수의 하나로 초임계 이산화탄소의 밀도, 점도, 확산계수, 용해도에 큰 영향을 준다. 따라서 이러한 압력의 변화에 따른 추출 효율을 살펴볼 필요가 있다. 압력이 증가함에 따라 추출 수율이 증가하나, 일정 압력 이상에서는 그 수율이 일정하게 유지됨을 알 수 있다. 이는 압력의 증가로 초임계 이산화탄소의 밀도가 증가하고 이에 따라 비극성 용질의 용해도가 증가하나 내부 확산은 정해진 값으로 압력이 증가해도 그 효율은 일정한 것으로 판단된다 (Fig. 2). 온도 또한 초임계 추출의 중요한 변수의 하나지만 압력만큼 밀도에 큰 영향을 미치지 않는다. 천연물의 추출에 있어서 시료의 열변성도 고려해야 하므로

온도의 변화 폭은 크지 않은 것이 사실이다. 결과에서 알 수 있듯이 온도에 의한 추출 효율의 차이는 압력에 비해 현저히 작다 (Fig. 3).

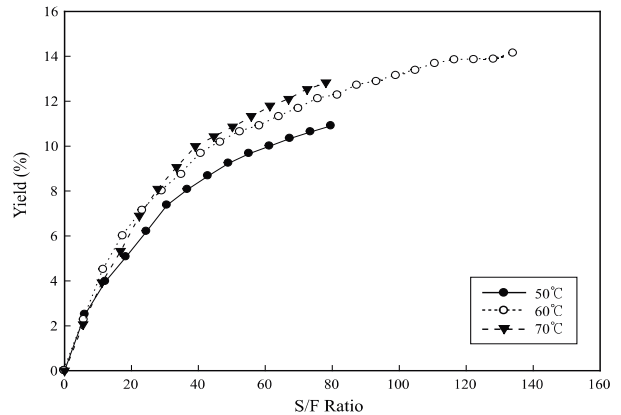


Fig. 3. Yield of extracted material vs. extraction temperature.

세포벽이 두껍고 단단한 조직체인 *Haematococcus pluvialis*로부터 아스타잔틴을 추출하기 위해서는 세포벽을 파괴하여 세포 안의 색소를 용매로 녹아나게 하여야 한다. 본 실험에서는 고압에 의하여 순간적으로 세포벽을 파괴하는 air jet mill 공법을 이용하였으며 그 압력을 증가하여 입자 크기를 작게 함에 따라 수율이 높아지는 결과를 얻었다 (Fig. 4).

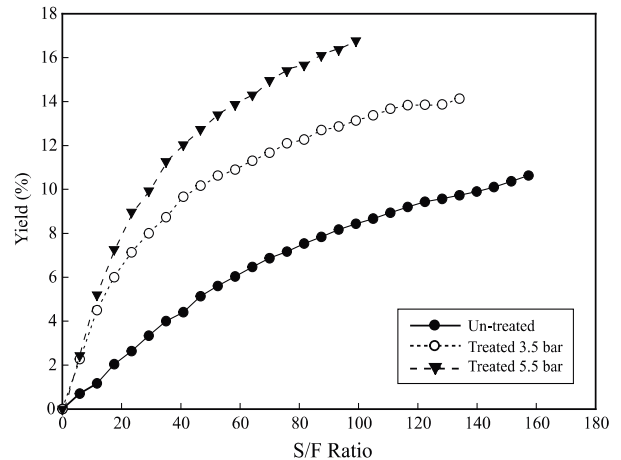


Fig. 4. Yield of extracted material vs. particle size.

#### 3.2. 리포좀 크기 및 안정성

리포좀의 열역학적 안전성을 유지하기 위해서는 입자를 작게 하고 입자의 분포를 협조하게 하는 size distribution의 효율을 증가시키는 노력이 중요하다. 고압 Homogenizer를 이용한 리포좀의 형성에서 리포좀화에 따른 안정성을 살펴보기 위하여 일반 emulsion과 리포좀을 형성하여 측정된 결과 일반 emulsion은 3342 nm 이었고 고압 호모제나이저 (Panda, Niro Soavi, Italy)를 이용하여 1000 bar에서 3회 통과시켰을 때 안정한 나노 리포좀이 형성되었으며 size 측정결과 입자 크기는 166 nm 임을 확인 하였다. 입도 분포 결과에서도 일반 emulsion은 두 개의 peak를 보이거나 liposome의 경우 단일

peak를 나타냄을 알 수 있다 (Fig. 5).

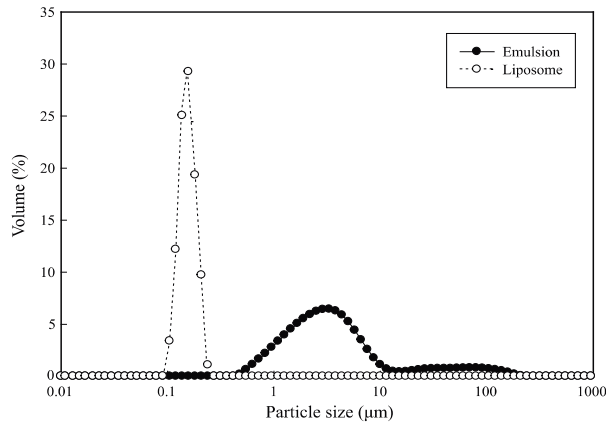


Fig. 5. Particle size distribution of astaxanthin emulsion and liposome.

일반 emulsion의 경우 광, 열 환경에 노출시켰을 때 입자가 응집되어 크기가 커지는 거동을 보였으며 육안으로도 층이 분리되는 것을 관찰할 수 있었다. 반면 리포솜의 경우 Fig. 6과 같이 입자의 크기도 유지되었으며 층 분리 현상도 나타나지 않았다. 광 및 열 환경에 노출 후 색차측정 ( $\Delta E$ ) 결과 (Fig. 7-8) 리포솜의 경우 일반 emulsion 보다 색변화가 없어, 아스타잔틴의 안정성이 더욱 향상된 것을 확인할 수 있다.

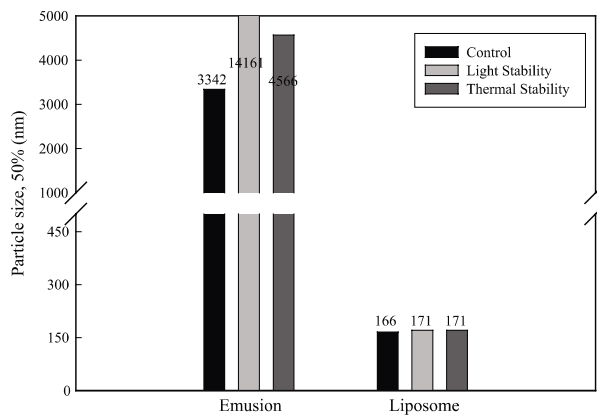


Fig. 6. Light and thermal stability of astaxanthin emulsion and liposome.

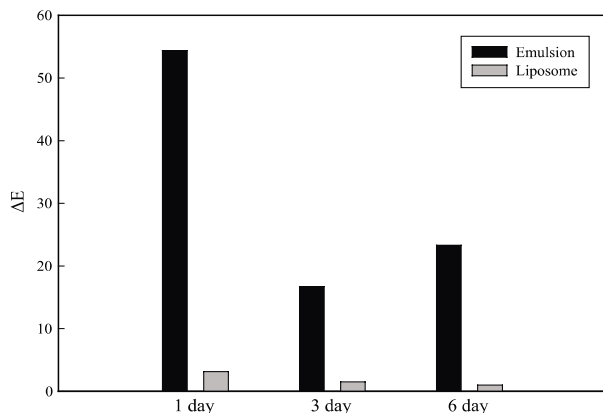


Fig. 7. Light stability of astaxanthin emulsion and liposome.

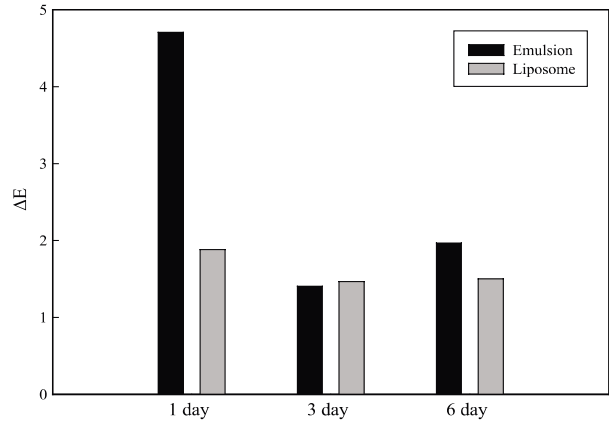


Fig. 8. Thermal stability of astaxanthin emulsion and liposome.

#### 4. 결론

항산화 특성이 탁월하여 매우 우수하나 열 및 광 안정성이 취약한 것으로 알려진 아스타잔틴의 안정성 증진을 위하여 *Haematococcus pluvialis*로부터 초임계 이산화탄소를 이용하여 추출한 후 리포솜화 하였다. 아스타잔틴 리포솜의 경우 일반 emulsion 대비 작은 입자 크기를 나타내었으며 광, 열 환경에 노출시켰을 때에도 입자 크기가 작고 단일 형태로 유지되는 거동을 살펴볼 수 있었다. 이를 통하여 아스타잔틴을 리포솜화 함으로써 그 안정성을 극대화시킬 수 있을 것으로 판단된다.

#### 감사

본 연구는 (재)대한화장품산업연구원 글로벌코스메틱연구개발사업단의 연구비 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

#### References

1. Park, E. K., M. W. Seo, and C. G. Lee (2001) Effects of medium compositions for the growth and the astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29: 4227-4233.
2. Becker, E. W. (1994) *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
3. Bon, J. A., T. D. Leathers, and R. K. Jayaswal (1997) Isolation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Lett.* 19: 109-112.
4. Borowitzka, M. A. (1997) Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *J. Appl. Phycol.* 9: 393-401.
5. Borowitzka, M. A. (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. *J. Biotechnol.* 70: 313-321.
6. Borowitzka, M. A. and L. J. Borowitzka (1988) *Micro-algal Biotechnology*. Ambridge University Press, Cambridge, UK.
7. Britton, G., R. J. Weesie, D. Askin, J. D. Warburton, L. Gallardo-Guerrero, F. J. Jansen, H. J. M. D. Groot, J. Lugtenburg, J. P.

- Cornard, and J. C. Merlin (1997) Carotenoid blues: structural studies on carotenoproteins. *Pure Appl. Chem.* 69: 2075-2084.
8. Seki, T., H. Sueki, H. Kono, K. Suganuma, and E. Yamashita (2001) Effects of astaxanthin from haematococcus pluvialis on human skin. Patch testing skin repeated application test effect on wrinkle reduction. *Fragrance Journal* 12: 98-103.
  9. Arakane, K. (2002) Superior skin protection via astaxanthin. *Crotenoid Research* 5: 21-24.
  10. Fujita, T., M. Satake, T. Watanabe, C. Kitajima, W. Miki, K. Yamaguchi, and S. Konosu (1983) Pigmentation of cultured red sea bream with astaxanthin purified from krill oil. *Nippon Suisan Gakkaishi* 49: 1855-1869.
  11. Johnson, E. A. (1991) Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotechnol.* 11: 297-326.
  12. Nelis, H. J. and A. P. De Leenheer (1991) Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *Journal of Applied Bacteriology* 70: 181-191.
  13. Lyons, N. M. and N. M. O'Braen, (2002) Modulatory effects of an algal extract containing astaxanthin on UVA-irradiated cells in culture. *J. Dermatol. Sci.* 30: 73-84.
  14. Fang, T. J. and Y. S. Cheng (1993) Improvement of astaxanthin production by Phaffia rhodozyma through mutation and optimization of culture conditions. *J. Ferment Bioeng.* 75: 466-469.
  15. Palozza, P. and N. I. Krinsky (1992) Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch. Biochem. Biophys.* 297: 291-295.
  16. Miki, W. (1991) Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 63: 141-146.
  17. Kobayashi, M. and Y. Sakamoto (1999) Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga, Haematococcus pluvialis. *Biotechnology Letters* 21: 265-269.
  18. Rattray, J. B., A. Schibeci, and D. K. Kidby (1975) Lipids of yeasts. *Bacteriol. Rev.* 39: 197-231.
  19. Chisti, Y. and M. Y. Murray (1986) Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme Microb. Technol.* 8: 194-203.
  20. Johnson, E. A., T. G. Villa, M. J. Lewis, and H. J. Phaff (1978) Simple method for the isolation of astaxanthin from the basidiomycetous yeast Phaffia rhodozyma. *Appl. and Environ. Microbiol.* 35: 1155-1159.