

*Phaffia rhodozyma*로부터 천연성 고기능 항산화제 Astaxanthin의 미셀형성을 통한 가용화 및 추출

김영범, 이은규, 이상윤¹, 임교빈¹

한양대학교 화학공학과 생물공정연구실, 수원대학교 화학공학과¹

전화 (031) 400-4072, Fax (031) 408-3779

Abstract

The capacity of micelle formation between astaxanthin and various surfactants was compared. Tween 20 was identified the most suitable surfactant in terms of astaxanthin extraction capacity. 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 effect of micelle formation condition, such as molar ratio of astaxanthin and Tween 20, pH and ionic strength was also investigated. pH and ionic strength showed no significant effects. Antioxidant activity of astaxanthin was twice of α -tocopherol and 4 times of β -carotene. Crude astaxanthin extract from the yeast cell seemed to be less degraded than pure astaxanthin by air and light exposure, probably because of the presence of other carotenoids and lipids. Under the optimal conditions, the molar ratio of micelle formed was found to be 1 : 12 for astaxanthin : Tween 20.

서론

착색용 사료첨가제로 쓰이고 있는 astaxanthin은 일종의 지질계통 물질로서 다른 카로테노이드나 토코페롤보다도 뛰어난 항산화 효과를 가지고 있으며¹⁻³⁾, 면역증강/억제⁴⁾, 혈압강하, 소화촉진 등 여러 가지 기능성들이 밝혀지면서 식품첨가제 및 의약품, 화장품 등의 소재로서의 활용이 기대되고 있는 물질이다⁵⁾. Astaxanthin을 효모세포에서 추출하고 제제화하기 위해서는 다단계의 유기용매추출과 증발 및 진공건조 등이 요구되어 수율은 매우 낮고 막대한 에너지가 요구되며, 잔류 유기용매에 의한 독성으로 식품 및 의약품으로의 이용에 커다란 장애요인이 되고 있다. 따라서 유기용매를 사용하지 않는 새로운 추출법이 필요하며 초임계유체 추출 공정이 연구되고 있다. 또 다른 방법으로 계면활성제를 이용한 미셀형성을 통해 친유성인 astaxanthin을 수용액내에 가용화시킨 후 용액상에서 추출할 수 있다. 미셀용액은 입자크기가 매우 작고 열역학적으로 안정하며 제조하기 쉽고 여과에 의해 멸균될 수 있다는 등의 장점을 가지고 있어 약물송달제와 화장품등에도 많은 관심이 모아

지고 있다⁶⁾. 본 연구에서는 *P. rhodozyma*를 파쇄시킨 후 Tween 20에 의해 형성된 미셀내부에 astaxanthin을 포집, 가용화시켜 추출하는 공정에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

세포파쇄

P. rhodozyma 세포내 축적된 색소를 추출하기 위해 건조된 세포 4 g을 증류수 및 계면활성제 용액 100 ml에 넣어 24시간 방치 후 French Press로 12,000 psi에서 4 pass시켜 파쇄하였으며 파쇄정도는 파쇄 시간에 따라 방출되는 색소의 농도를 465 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

계면활성제 추출법

*P. rhodozyma*로부터 astaxanthin의 추출은 0.1M의 계면활성제 용액을 용매로 하여 파쇄 후 원심분리(13,000rpm, 10분)하여 미셀이 형성된 상층액을 분취하여 RP-HPLC를 이용, 465 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sigma에서 구입한 98% astaxanthin 표준품을 이용하여 표준곡선을 작성한 뒤 astaxanthin의 추출정도를 측정하였다.

항산화력 평가방법

Astaxanthin의 항산화력 평가는 α -tocopherol 및 β -carotene과 대비하여 평가하였다. 항산화력의 측정은 linoleic acid 0.043 g 및 10%(w/v) Tween 20 50 μ l를 취하여 증류수, 그리고 각각의 시료를 50 μ l씩 첨가하여 최종량을 40 ml로 한 후 37 $^{\circ}$ C의 항온조에서 5%(w/v) ferrous ammonium sulfate 50 μ l 첨가하여 용존산소농도의 감소를 측정하여 평가하였다.

안정성 평가방법

Astaxanthin 표준품(98% 농도) 및 *P. rhodozyma*로부터 얻은 crude astaxanthin을 유기용매추출과 계면활성제 추출 후 일정농도로 하여 빛과 공기에 노출시킨 후 각 시간별로 시료를 취하여 astaxanthin의 잔유량을 측정하였다

결과 및 고찰

계면활성제 종류에 따른 영향을 보기 위해 Tween 20, TritonX-100, SDS를 사용하였을 때 각각 396, 265, 139 μ g/g-yeast로 Tween 20이 가장 높은 추출능을 보였다(Fig. 1). 농도에 따른 추출효과를 보기위해 Tween 20 농도를 1 ~ 20%로 변화시키면서 실험을 수행하였다. Tween 20의 농도가 1%일 때 192, 5%일 때 286, 10%일 때 296, 20%일 때 276 μ g/g-yeast로 10%일 때 가장 높았다(Fig. 2). Tween 20을 10%(w/v)로 고정하고 pH, ionic strength가 미셀형성에 의한 추출능에 미치는 영향을 검토하였다. pH 1일 때 382, pH 3일 때 324, pH 5.3일 때 365, pH 11일 때

386 $\mu\text{g/g}$ -yeast으로 pH는 전반적으로 큰 영향을 미치지 않았다(Fig. 3). 또한 ionic strength의 변화에 따른 미셀 형성능을 보기 위해 0.01M NaCl을 첨가 하면서 변화를 지켜 보았다. Ionic strength가 증가함에 따라서 서서히 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4).

용존산소 분석법에 의하여 astaxanthin의 항산화력을 같은 carotenoid류인 β -carotene과 기존에 항산화제로 널리 쓰이는 α -tocopherol과의 항산화력을 비교한 결과 astaxanthin의 항산화력은 α -tocopherol의 약 2배였고, β -carotene의 4배였다. 항산화제를 첨가하지 않았을 때는 DO가 0으로 감소하는데 48시간이 걸렸다(Fig. 5).

Astaxanthin의 빛과 공기에 대한 안정성을 알아보기 위하여 48시간 동안 노출에 따른 astaxanthin의 잔유량을 RP-HPLC에 의해 분석하였다. 노출시간에 따라 astaxanthin의 양을 비교하였을 때 클로로포름속의 순수한 astaxanthin과 세포파쇄 후의 crude astaxanthin 그리고 미셀을 형성한 수용액상의 crude astaxanthin의 경우 시간이 지나도 거의 잔유량의 감소를 보이지 않았다. 순수한 astaxanthin이 미셀을 형성하여 가용화 되어 있는 경우는 용매속의 산소와 충분히 반응하여 급격히 astaxanthin의 잔유량이 감소하였으며 약 20시간 후에 1/2 수준으로 감소함을 보였다.(Fig. 6)

참고문헌

1. 안길환, "붉은 Yeast *Xanthophyllomyces Dendrorhous (phaffia rhodozyma)*로부터 Astaxanthin의 생산"(1996). *한국미생물학회*, **22(2)**, 128-136.
2. Wataru Miki, "Biological function and activities of animal carotenoid"(1991), *Pure & Appl. Chem.*, **63**, 141-146.
3. J. Tera, "Antioxidant Activity of β -Carotene-Related Carotenoids in Solution"(1989), *Lipids*, **24(7)**, 659-661.
4. A. Bendich, "Cartenoids and the Immune system in carotenoids"(1989), Plenum press, New York, 323-335.
5. K. Hata, "微生物由来のアスタキサンチンによる赤色色"(1994)
6. H. N. Bhargava, A. Narurkar and L. M. Lieb, "Using microemulsions for drug delivery"(1987), *Pharm. Technol.* 46.

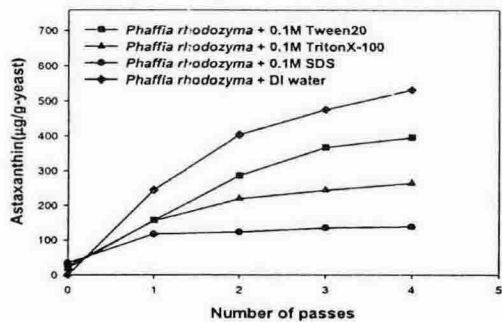


Fig. 1 Astaxanthin release profile during *P. rhodozyma* disruption using various surfactants

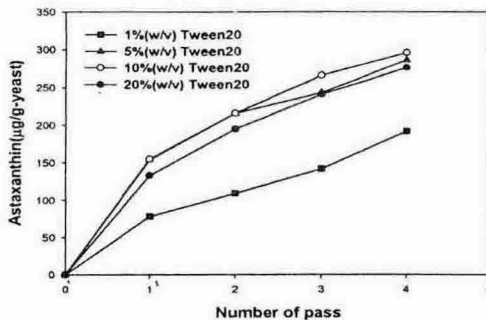


Fig. 2 Effect of Tween 20 concentration on astaxanthin extraction by micelles

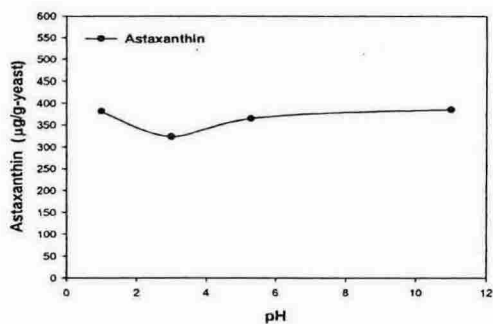


Fig. 3 Effect of pH on the capacity of astaxanthin / Tween20 micelle formation

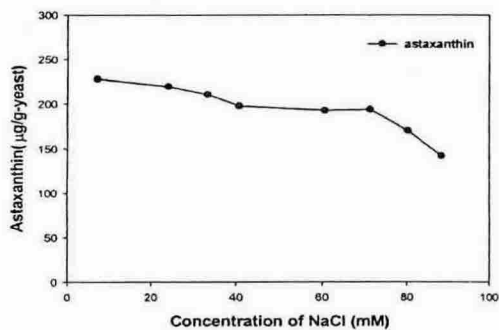


Fig. 4 Effect of ionic strength on the capacity of astaxanthin/Tween20 micelle formation

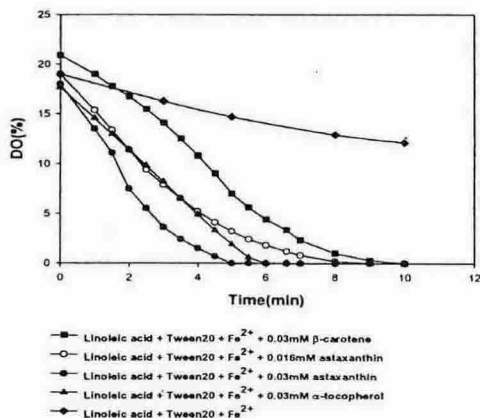


Fig. 5 Measurement of antioxidant activity by DO analysis

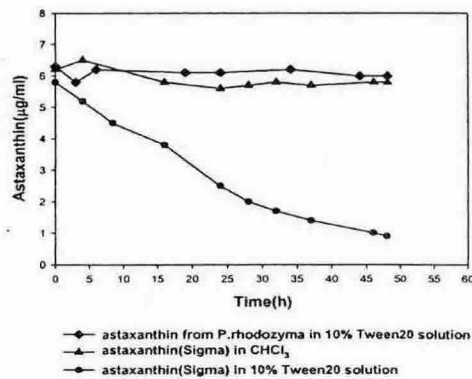


Fig. 6 Astaxanthin degradation by air and light exposure