(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0030327
(43) 공개일자 2010년03월18일

(51) Int. Cl.
C12M 1/00 (2006.01) *C12P 5/00* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0089226
(22) 출원일자 2008년09월10일
심사청구일자 2008년09월10일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교
(72) 발명자
이철균
서울 서초구 반포본동 주공 Apt 91-501
박제권
인천시 연수구 연수3동 풍림1차아파트, 109동 705호
(74) 대리인
이원희

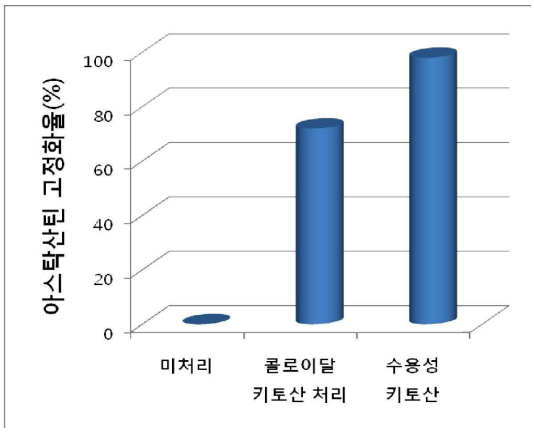
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 광합성 미세조류로부터 추출한 아스타산틴의 고정화

(57) 요 약

본 발명은 키토산을 이용하여 카로티노이드계 색소를 고효율로 추출하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로, 카로티노이드계 색소가 축적된 균체를 파쇄시키면서 냉각한 물을 첨가함으로써 에멀젼화된 세포파쇄물로부터 상기 색소를 키토산을 이용하여 흡착함으로써 고효율로 카로티노이드계 색소를 추출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 아스타산틴을 포함하는 다른 카로티노이드계 색소 추출 및 고정화에 유용하게 사용될 수 있으며, 본 발명의 방법에 의해 추출 및 키토산에 고정화된 색소는 고부가가치성 의료, 화장료, 식품 및 식품 첨가제 또는 사료 또는 사료 첨가제의 기능성 소재로 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	38058
부처명	과학기술부
연구사업명	미생물유전체활용기술개발사업
연구과제명	Frontier 사업단(21C 프론티어 연구개발사업)
주관기관	인하대학교
연구기간	2005년 04년 01일 ~ 2008년 03월 01일

특허청구의 범위

청구항 1

1) 카로티노이드계 색소를 고농도로 함유하는 균체를 농축한 후, 급냉동시키는 단계;

2) 상기 농축된 균체를 파쇄하면서 냉각된 물을 첨가하여 세포파쇄물 에멀젼을 형성시키는 단계;

3) 상기 세포파쇄물 에멀젼에 탈아세틸화된 키토산을 0.1 ~ 1 : 1의 부피비로 첨가하여, 상기 키토산에 카로티노이드계 색소를 흡착시키는 단계; 및,

4) 상기 카로티노이드계 색소가 흡착된 키토산을 이온교환수로 세척하는 단계를 포함하는 키토산을 이용하여 카로티노이드계 색소를 고정화하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 카로티노이드계 색소는 아스탁산틴(astaxanthin), 베타-카로틴(beta-caroten), 라이코펜(lycopene), 베타크립토산틴(beta-cryptoxanthin) 및 지아산틴(zeaxanthin) 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 단계 1)의 카로티노이드계 색소를 고농도로 함유하는 균체는 상기 균체의 6 내지 85 중량%로 카로티노이드계 색소를 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 단계 2)의 물은 세포파쇄물 부피의 2 내지 30배로 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 단계 2)의 물은 정제수, 이온교환수, 알칼리 이온수, 음이온수, 은이온수 및 황토지장수로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 광합성 미세조류로부터 추출한 아스탁산틴(astaxanthin)의 고정화 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 항산화 물질인 아스탁산틴(astaxanthin; 3,3'-dihydroxy-β,β'-carotene-4,4'-dione)은 특히 효모균주인 파피아 로드지마(*Phaffia rhodozyma*, Andrewes *et al.*, *Phytochemistry,* 15:1009-1001, 1976), 녹조류인 헤마토코커스(*Haematococcus* species, Renstrm B *et al.*, Phytochemistry, 20:2561-2564, 1981) 및 박테리아(*Brevibacterium*, Hiroshi Iizuka *et al.*, *J Gen Appl Microbiol*, 15:127-134, 1969) 등에서 생성되는 것으로 알려져 있다. 또한 아스탁산틴은 해양동물과 담수동물(Andrewes *et al.*, *Phytochemistry,* 15:1003-1007, 1976)등에 널리 분포되어 있으며, 특히 새우나 게 등의 갑각류, 조류의 부리, 난황, 송어 및 연어 등에서 주홍색을 띄는 것으로 알려져 있다(Johnson *et al.*, *Critical Reviews in Biotechnology* 11(4):297-326, 1991).

[0003] 상기 아스탁산틴은 색상의 증진, 풍미 효과, 비타민 A의 전구체, 면역기능의 활성화, 산소 라디칼 제거(Oxygen free radical scavenger)에 의한 항암작용(Burde Sandesh Kamath *et al.*, *European Journal of Pharmacology*, 590(1-3):387-395, 2008) 및 노화억제(Savoure N *et al.*, *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 65:79-86, 1995) 등의 중요한 대사적 역할을 수행하고 있으며, 이에 항암 및 항산화 효과를 가진 고부가의 아스탁산틴에 대한 새로운 용도가 활발히 개발되고 있다.

[0004] 아스탁산틴은 다른 카로티노이드계 색소나 비타민 E, 토코페롤보다도 500-1000배 정도 훨씬 뛰어난 항산화 효과를 보이는 것이 증명되어(Kurashige *et al.*, *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 22:2738, 1990), 식용 색소뿐만

아니라 의약적(Johnson EA & An GH, *Crit. Rev.Biotechnol.* 11:297-326, 1991)으로도 중요성을 지닌 것으로 여겨진다. 특히 일본의 3대 화장품 회사 중 하나인 코세(KOSE) 사에서 1999년부터 립스틱, 화운데이션, 스킨케어 로션 등으로 발매하여 현재 매우 인기 높은 상품으로 판매되고 있다.

[0005] 호프만-라로슈(Hoffmann-LaRoche) 사는 8%(w/w)의 합성 아스탁산틴을 $2,000/kg에, 일본의 이타노(Itano) 사는 갑각류에서 추출한 10%(w/w)의 아스탁산틴을 $8,000/kg에 시판하고 있다. 인공화학합성법으로 만들어진 아스탁산틴은 화장품이나 식품첨가제로서의 안정성에 대한 문제가 제기될 수 있어, 생물학적 생산법이 이용되기도 하나, 게나 새우 등의 갑각류에서 아스탁산틴 색소추출은 색소함량이 적고 추출과정이 매우 어려우며, 효모 파피아 로드지마 균주는 성장률이 높으나 균주의 색소 생산성이 적고 단단한 세포벽 때문에 색소 추출에도 많은 어려운 점이 있다.

[0006] 한편 광합성 미세조류인 헤마토코커스 속 균주들은 대부분 성장이 매우 느리며 배양 시 오염이 잘되고, 아스탁산틴 색소의 추출에 어려움이 있으나, 고농도의 아스탁산틴 색소를 축적하는 것으로 알려져 있다. 이에 본 발명자들은 대한민국 특허 제 0461015(2004.12.01)호, 루모스탯 방식을 이용한 광합성 미생물의 배양 방법 및 제 0399977(2003.09.18)호, 미세조류의 대량배양을 위한, 단위 장치형 광생물 반응기 등을 이용하여 공지의 최적화한 배양조건에서 고농도로 배양하는 방법을 개시한 바 있다.

[0007] 한편, 효율적인 색소추출을 위한 여러 가지 방법들이 제시되었다. 세포 내에 축적된 아스탁산틴을 효과적으로 회수하기 위하여 여러 가지 방법들이 개발되어 왔으나, 많은 종류의 유기용매를 이용하는 방법들이 대부분을 차지하고, 또한 유기용매 이용 과정 및 분말형태의 색소를 얻기 위한 동결건조 과정 등이 필수적이며, 고가의 처리비용에 따른 단가 상승으로 상업적 이용에 어려움이 있다. 즉, 고순도의 아스탁산틴 색소 추출물을 얻는 효율적인 방법이 아직 상업적인 수준에 이르지 못하고 있다.

[0008] 종래의 방법들을 간략히 소개하자면 하기와 같다:

[0009] 첫째, 기계적인 처리방법으로써, 배양 채집된 균주를 액체 질소로 냉동시킨 후, 임펙트 밀러(high speed impact mill or jet mills)를 이용하여 분말화 하고, 균주의 세포벽을 파쇄하여 아스탁산틴을 추출하는 방법(미국특허 제 4,871,551호, 제 6,022,701호)이 알려져 있다.

[0010] 둘째, 물리적인 방법으로써, 프렌치 프레슈어(French pressure)나 호모게나이저(homogenizers)와 같은 기계적인 방법을 이용하여 세포벽을 깨뜨린 후 용매로 추출하는 방법이 있으며, 또한 마이크로웨이브를 처리하고, 에탄올, 메탄올, 아세톤 및 이들의 혼합용매를 이용하여 추출하는 방법(대한민국 특허 제 2000-0072136호)이 알려져 있다.

[0011] 셋째, 생물학적 처리방법의 한 예로, 파피아(Phaffia) 효모를 트리코데르마 레에세이(Trichoderma reesei ATCC 13631) 유래 세포벽 분해효소를 이용하는 방법이 알려져 있다(대한민국 특허 제 1995-0005983).

[0012] 넷째, 산화방지제 및/또는 오일을 포함하는 수-불혼화성 유기 용매를 사용함으로써 활성 성분이 미분된 분말상 제제를 제조하는 방법(대한민국 특허 제 1999-0072792) 등이 알려져 있다.

[0013] 상기와 같은 여러 가지 방법을 사용하여 세포벽을 파괴하여 카로티노이드계(carotenoids) 색소를 추출할 경우 낮은 색소 추출률과 높은 색소의 파괴율, 그리고 산업적 적용 시 많은 노동력과 높은 처리비용이 드는 문제점들이 존재한다. 또한 직접적으로 에탄올, 아세톤 등의 유기용매로 카로티노이드를 추출하는 제조방법들은 추출효율이 효율적이지 못하고 처리비용이 높으며, 유기용매를 완전히 제거하기 위한 처리비용도 높기 때문에 실용화에 있어 많은 문제점이 있다고 사료된다.

[0014] 이에, 상기 문제점을 해결하기 위하여 본 발명자들은 아스탁산틴이 축적된 미세조류에 냉각한 이온교환수를 첨가하면서 세포를 파쇄시킴으로써 에멀젼화된 세포파쇄물에서 아스탁산틴을, 키토산을 이용하여 흡착의 방법으로 고정화한 후, 상기 고정화율이 매우 높은 것을 확인하고, 본 발명의 방법이 고효율 아스탁산틴을 추출에 적합함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 균체에 고농도로 포함된 카로티노이드계 색소를 키토산에 흡착하여 상기 카로티노이드계 색소를 고정화하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0017] 1) 카로티노이드계 색소를 고농도로 함유하는 균체를 농축한 후, 급냉동시키는 단계;

[0018] 2) 상기 농축된 균체를 파쇄하면서 냉각된 물을 첨가하여 세포파쇄물 에멀젼을 형성시키는 단계;

[0019] 3) 상기 세포파쇄물 에멀젼에 탈아세틸화된 키토산 수용액 또는 콜로이달 키토산을 0.1 ~ 1 : 1의 부피비로 첨가하여, 상기 키토산에 카로티노이드계 색소를 흡착시키는 단계; 및,

[0020] 4) 상기 카로티노이드계 색소가 흡착된 키토산을 이온교환수로 세척하는 단계를 포함하는 키토산을 이용하여 카로티노이드계 색소를 고정화하는 방법을 제공한다.

[0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명은

[0023] 1) 카로티노이드계 색소를 고농도로 함유하는 균체를 농축한 후, 급냉동시키는 단계;

[0024] 2) 상기 농축된 균체를 파쇄하면서 냉각된 물을 첨가하여 세포파쇄물 에멀젼을 형성시키는 단계;

[0025] 3) 상기 세포파쇄물 에멀젼에 탈아세틸화된 키토산을 0.1 ~ 1 : 1의 부피비로 첨가하여, 상기 키토산에 카로티노이드계 색소를 흡착시키는 단계; 및,

[0026] 4) 상기 카로티노이드계 색소가 흡착된 키토산을 이온교환수로 세척하는 단계를 포함하는 키토산을 이용하여 카로티노이드계 색소를 고정화하는 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 비성숙(immature cyst) 상태를 유지하도록 고농도로 배양한 헤마토코커스 라커스트리스(*Haematococcus lacustris*)에, 고광도 빛의 스트레스를 가함으로써 아스탁산틴(astaxanthin)의 생산을 유도하였다(도 1 참조). 고농도의 아스탁산틴을 포함한 상기 균체를 원심분리로 수득하여 급냉동 후 세포파쇄 하였다. 상기 세포파쇄 과정 동안 냉각된 이온교환수를 소량씩 첨가함으로써 아스탁산틴을 포함한 상기 세포파쇄물이 에멀젼화 되도록 하였다. 상기 세포파쇄물 에멀젼에 탈아세틸화된 콜로이달 키토산 또는 수용성 키토산을 동량의 부피비로 첨가하여, 상기 키토산에 아스탁산틴을 흡착시킨 후, 이온교환수로 한번 더 세척하였다(도 2 참조). 상기 키토산에 아스탁산틴이 고정되기 전과 후의 아스탁산틴 함유량을 측정하여, 고정률을 측정한 결과, 콜로이달 키토산의 고정률은 68-80%이었고, 또한, 수용성 키토산의 경우 대략 95-98%의 고정화율을 얻었다(도 3 참조). 또한 상기 고정화율은 사용한 콜로이달 키토산량과 에멀젼화한 아스탁산틴을 포함하는 파쇄액의 농도에 따라 좌우되었다(데이타 없음). 이에, 본 발명의 방법은 카로티노이드계 색소를 고농도로 추출하는 데에 효과적으로 이용될 수 있다.

[0028] 단계 1)의 카로티노이드계 색소에는 아스탁산틴(astaxanthin), 베타-카로틴(beta-caroten), 라이코펜(lycopene), 베타크립토산틴(beta-cryptoxanthin), 지아산틴(zeaxanthin) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 단계 1)의 카로티노이드계 색소를 고농도로 함유하는 균체는 상기 균체의 6~10 내지 80~85 중량%로 카로티노이드계 색소를 포함하는 균체를 의미한다. 상기 색소의 70 내지 85 중량%로 아스탁산틴을 포함하는 균체를 사용하는 것이 바람직하며, 구체적으로 효모균주인 파피아 로드지마(*Phaffia rhodozyma*, Andrewes *et al.*, *Phytochemistry*, 15:1009-1001, 1976), 광합성 미세조류 및 박테리아(*Brevibacterium*, Hiroshi Iizuka *et al.*, *J Gen Appl Microbiol*, 15:127-134, 1969) 등이 있으며, 이때, 광합성 미세조류에는 헤마토코커스 라커스트리스(*Haematococcus lacustris*), 클라미도모나스 레인하드티이(*Chlamydomonas rainhardtii*) 및 헤마토코커스 플루비알러스(*Haematococcus pluvialus*) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 단계 1)의 급냉동 과정을 통해 세포파쇄를 돕고, 색소의 변질을 예방할 수 있다.

[0031] 단계 2)의 물은 세포파쇄물의 부피의 2 내지 30배, 바람직하게는 5 내지 20 배로 사용하는 것이 바람직하며, 상기 물에는 정제수, 이온교환수, 알칼리 이온수, 음이온수, 은이온수, 황토지장수 등이 있다. 상기 에멀젼에는 물 외에도 에탄올, 아세톤 등의 유기용매 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 이온교환수를 이용하였으나, 유기용매로 추출된 카로티노이드계 색소의 키토산에의 흡착율과 거의 차이가 없었다.

[0032] 단계 3)의 키토산은 본 발명의 방법에 이용되기 전에 미리 초산에 녹인 후, 중화하면서 입자 형태로 제조하여

이용하였는데, 흡착에 따른 아스탁산틴의 고정화시 흡착 표면적을 넓게 하기 위해 중화 시 빠른 교반 속도로 입자를 최대한 작게 만들었다. 상기 교반 속도는 200 내지 500 rpm이고, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 키토산은 콜로이달 키토산 또는 수용성 키토산의 형태로 사용될 수 있으며, 상기 키토산의 탈아세틸화도는 90 내지 98%인 것이 바람직하다. 상기 콜로이달 키토산 외에 콜로이달 키틴 역시 이용할 수 있으나 콜로이달 키토산에 비해 현저히 고정화율이 떨어져 비교결과를 제시하지 않으나 이용 가능하다. 또한 고정화율은 사용한 키토산과 세포파쇄물 에멀젼의 부피비에 따라 좌우될 수 있으며, 본 발명의 구체적인 실시예에서 키토산의 부피비가 높아질수록 고정화율이 높아졌다. 구체적으로, 부피비 콜로이달 키토산:세포파쇄액 = 1:1의 경우 약 68%의 고정화율을 얻었으며, 세포파쇄액의 부피비가 적어질수록 최대 80%의 고정화율을 얻었다.

[0033] 본 발명의 방법은 키토산을 첨가하기 이전에, 불순물을 제거하기 위하여 단계 2)의 에멀젼을 원심분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0034] 카로티노이드계 색소는 색상의 증진, 풍미 효과, 비타민 A의 전구체, 면역기능의 활성화, 산소 라디칼 제거에 의한 항암작용 및 노화억제 등의 중요한 대사적 역할을 수행하고 있는 것으로 알려져 있다. 이에 본 발명의 카로티노이드계 색소가 흡착된 키토산은 고부가가치성 의료, 화장료, 식품 및 식품 첨가제 또는 사료 또는 사료 첨가제의 기능성 소재로 사용할 수 있다.

[0035] 또한, 카로티노이드계 색소는 물에 녹지 않으며, 벤젠·에테르 등 지방을 녹이는 용매에 잘 녹는 성질을 갖으나, 본 발명의 방법으로 카로티노이드계 색소가 고정화된 키토산에 유기용매를 처리하더라도, 이미 키토산에 흡착에 의해 고정화된 카로티노이드계 색소는 쉽게 탈착되지 않았다(데이타 없음). 이에, 본 발명의 방법으로 카로티노이드계 색소가 고정화된 키토산은 개체에 투여되었을 때, 상기 색소를 서서히 방출할 수 있으므로 효과 지속기간이 긴 서방성 고분자 제형으로 사용될 수 있을 것이다.

효 과

[0036] 본 발명의 방법은 아스탁산틴을 포함하는 다른 카로티노이드계 색소 추출 및 고정화에 유용하게 사용될 수 있으며, 본 발명에 의해 추출 및 천연 고분자에 고정화된 색소는 고부가가치성 의료, 화장료, 식품 및 식품 첨가제 또는 사료 또는 사료 첨가제의 기능성 소재로 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0038] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0039] **<실시예 1> 콜로이탈 키토산을 이용한 아스탁산틴 고정화 효율 검사**

[0040] **<1-1> 헤마토코커스 라커스트리스의 고농도 배양 및 아스탁산틴 축적**

[0041] 광합성 미세조류 헤마토코커스 라커스트리스(*Haematococcus lacustris*; UTEX 16)를 1 L 광생물 배양기에서 5% CO_2를 0.2 vvm 속도로 주입, 흰 형광등(white fluorescent lamp)으로 40±2 μE·m^{-2}·s^{-1} 밝기 및 18-25℃의 조건으로 고농도의 세포 밀도(10^6~10^7/mℓ)로 6~7일 동안 배양한 후, 2일 동안 300 μE·m^{-2}·s^{-1} 밝기로 고광도 빛을 스트레스를 주어 세포 내 아스탁산틴의 축적을 유도하였다(도 1).

[0042] 이때, 배양 배지 조건은 하기와 같다: 246.5 mg/ℓ $NaNO_3$, 24.99 mg/ℓ $CaCl_2·2H_2O$, 73.95 mg/ℓ $MgSO_4·7H_2O$, 4.98 mg/ℓ $FeSO_4·7H_2O$, 74.9 mg/ℓ K_2HPO_4, 175.57 mg/ℓ KH_2PO_4, 25.13 mg/ℓ NaCl, 49.68 mg/ℓ $C_{10}H_{16}N_2O_8$(EDTA), 1.57 mg/ℓ $CuSO_4·5H_2O$, 1.19 mg/ℓ $Na_2MoO_4·2H_2O$, 11.13 mg/ℓ H_3BO_3, 1.44 mg/ℓ $MnCl_2·4H_2O$, 8.83 mg/ℓ $ZnSO_4·7H_2O$, 0.49 mg/ℓ $Co(NO_3)_2·6H_2O$, 6.06 mg/ℓ MoO_3, 30.86 mg/ℓ KOH, 0.98 mg/ℓ H_2SO_4, pH 6.5 ~ 7.5.

[0043] **<1-2> 아스탁산틴 추출**

[0044] 200 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상기 아스탁산틴이 축적된 균체를 수득하였다. 상기 수득한 균체에 액화질소를 붓거나 -80℃에서 냉동하여 급 동결한 후, 막자사발을 이용하여 파쇄하였다. 상기 파쇄 과정 시, 냉각 이온교환수를 첨가함으로써 추출된 색소를 에멀젼화 하였다.

[0045] **<1-3> 아스타산틴 고정화**

[0046] 상기 에멀젼화된 색소 추출물에 콜로이달 키토산(chitosan)(분자량 10,000~250,000 달톤)을 동량의 부피 비로 첨가하여 소수성을 갖는 지용성의 아스타산틴을 흡착시켜 고정화했다(도 2).

[0047] 상기 콜로이달 키토산은 묽은 초산(2%)에 1.5% 키토산의 농도로 녹인 90-98% 탈아세틸화된 키토산(태훈 바이오, 한국) 용액을 1 M 염화나트륨 용액으로 중화시킨 후, 이온교환수로 수차례 세척 후 정치시켜 얻은 침전물을 이용하였다. 이때, 아스타산틴은 상기 키토산에 흡착 작용으로 고정화되므로, 흡착 표면적을 최대화하기 위해, 상기 중화 시 빠른 교반(200-500 rpm)으로 입자를 최대한 작게 만들었으며, 콜로이달 키토산의 농도는 10 g/15 ㎖로 하였다.

[0048] **<1-4> 아스타산틴 고정화 효율 측정**

[0049] 콜로이달 키토산에 고정하기 전 및 후의 시료에 아세톤 1.0 ㎖을 첨가함으로써, 아스타산틴을 포함하는 지용성 색소를 용출하였다. 상기 아세톤의 OD_{475}의 흡광도를 측정함으로써 수학식 1의 계산식을 이용하여 아스타산틴의 함량 측정하였다.

수학식 1

[0050] $$\text{아스타산틴농도}(mg/L)=0.0045 X OD_{475}$$

[0051] 그 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이 그 효율은 68-80%로 높았다.

[0052] **<1-5> 파쇄액의 농도에 따른 고정화율**

[0053] 콜로이달 키토산(chitosan)량과 에멀젼화한 아스타산틴을 포함하는 파쇄액의 농도에 따른 고정화율을 측정하였다.

[0054] 구체적으로, 콜로이달 키토산 0.5 ㎖에 세포파쇄액(1.2 g 세포/이온교환수 15 ㎖) 0.1~1.0 ㎖을 넣어 흡착이 잘 되도록 혼합하여 실온(25℃)에서 2-5분 정도 정치시켰다. 14,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 실시예 1-4의 방법으로 고정화율을 측정하였다.

[0055] 그 결과, 부피비 콜로이달 키토산:세포파쇄액 = 1:1의 경우 약 68%의 고정화율을 얻었으며, 세포파쇄액의 부피비가 적어질수록 최대 80%의 고정화율을 얻었다.

[0056] **<실시예 2> 수용성 키토산을 이용한 아스타산틴 고정화 효율 검사**

[0057] 실시예 1-1 및 1-2의 방법으로 에멀젼화한 아스타산틴 추출물에 동량의 부피비로 초산에 녹인 2% 수용성 키토산을 첨가하여 잘 혼합한 뒤, 고정화된 수용성 키토산-아스타산틴 혼합체를 수득하기 위해 1 M의 염화나트륨 용액 또는 1 M 소듐 카보테이트(Na_2CO_3)로 중화시켜 중화에 따른 침전물을 획득하고 나머지 상층액은 제거하였다.

[0058] 실시예 <1-4>의 방법으로 수용성 키토산을 이용하여 아스타산틴을 고정화하기 전 및 후의 시료의 아스타산틴 함량을 측정한 후, 고정화율을 계산하였다.

[0059] 그 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이 대략 95-98%의 고정화율을 얻었다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 헤마토코커스 라커스트리스의 스트레스 조건에서 아스타산틴을 축적한 결과를 나타낸 도이다:

[0061] a: 적절한 배양조건에서 배양되는 비성숙 상태의 세포; 및,

[0062] b: 스트레스 조건에서 배양되어 붉은 색의 아스타산틴을 축적하고 있는 성숙 상태의 세포.

[0063]

[0064] 도 2는 키토산에 고정화된 헤마토코커스 라커스트리스 유래 아스타산틴을 나타낸 사진도이다:

[0065] a: 콜로이달 키토산; 및,

[0066] b: 아스타산틴이 고정화된 콜로이달 키토산.

[0067]

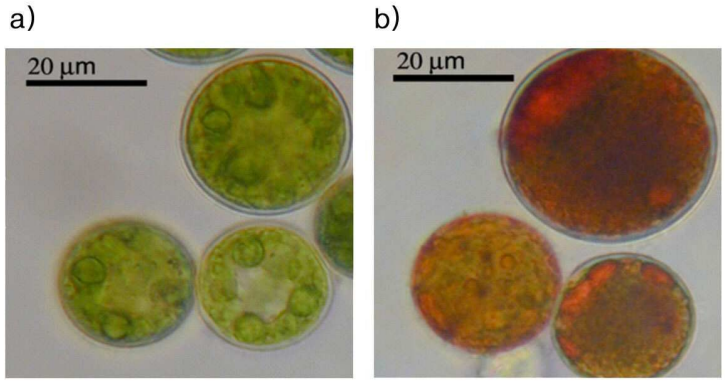
[0068] 도 3은 키토산 유형별 헤마토코커스 라커스트리스 유래 아스탁산틴의 고정화율을 나타낸 도이디:

[0069] a: 콜로이달 키토산; 및,

[0070] b: 수용성 키토산.

도면

도면1



도면2



도면3

