식품공학 학사학위논문

미세조류 *Haematococcus pluvialis*에 함유되어 있는 astaxanthin의 추출 방법 최적화 및 안정성 평가

목포대학교 공과대학

식품공학과

박 태 희

송 현 진

문 지 영

지도교수: 마 승 진

2024년 2월

미세조류 *Haematococcus pluvialis*에 함유되어 있는 astaxanthin의 추출 방법 최적화 및 안정성 평가

이 논문을 식품공학 학사학위 논문으로 제출함

목포대학교 공과대학

식품공학과

박 태 희

송 현 진

문 지 영

지도교수 마 승 진

상기자의 식품공학 학사학위 논문을 인준함

심사위원장 허 재 영 (인)

심사위원 마 승 진 (인)

2024년 2월

목 차

국문초록

제1장 서 론 ····· 1

제2장 재료 및 방법 ····· 4

1. 실험 재료 ····· 4
2. 실험 방법 ····· 5
   1) 추출시료 astaxanthin의 함량 분석 ····· 5
   2) 추출 방법 ····· 8
   3) 색소 안정성 평가 ····· 9
3. 통계처리 ····· 10

제3장 결과 및 고찰 ····· 11

1. 분석법 확립 ····· 11
   1) UV/VIS spectrophotometer를 이용한 분석 ····· 11
   2) HPLC를 이용한 분석 ····· 14
2. 추출 방법 탐색 ····· 16
   1) 추출 방법 탐색 ····· 16
   2) 추출 온도 최적화 ····· 18
   3) 추출 시간 최적화 ····· 20
   4) 추출 조건 확립 ····· 22
   5) 아임계 추출 ····· 23
   6) 초임계 추출 ····· 25
3. 색소 안정성 평가 ····· 27

제4장 결 론 ····· 29

참고문헌 ····· 30

미세조류 *Haematococcus pluvialis*에 함유되어 있는 astaxanthin의 추출 방법 최적화 및 안정성 평가

박태희, 송현진, 문지영

목포대학교 공과대학 식품공학과

(지도교수 : 마 승 진)

(초록)

식품의 색은 관능성을 높여 소비자의 기호도 및 식품의 가치를 높이는 중요한 역할을 하는 요소이다. 현재 식품산업에서 이용되고 있는 색소는 대부분 합성색소로 이는 건강적 측면에서 다양한 문제를 야기할 수 있다. 최근 소비자의 건강에 대한 인식고조로 인해 천연색소의 개발 및 사용이 활발하게 이루어지고 있다.

Astaxanthin은 카로티노이드의 일종으로 항산화 효능을 가진 천연 붉은 색소로 새우, 게 등의 갑각류를 비롯하여 수생동물에 함유되어 있다. 미세조류 중 *H. pluvialis*는 건강식품, 항산화제, 의약품 등의 원료로 활용되는 astaxanthin의 생산원료로 스트레스 환경에 노출될 경우, 자기보호기작으로 astaxanthin은 체내에 축적하게 되는데 그 함유량이 다른 공급원에 비해 높다고 알려져 있다.

본 연구에서는 *H. pluvialis* 로부터 astaxanthin을 효율적으로 추출할 수 있는 추출 최적 방법 및 조건을 확립하기 위해 HPLC와 spectrophotometer를 이용하여 astaxanthin의 함량을 측정하였다. 그 결과 Ethanol 추출이 수율이 가장 좋은 것으로 확인되었다. 또한 가공식품 소재로써의 상용화 가능성 평가를 위하여 astaxanthin의 산화, 빛, 온도, pH에 대한 안정성을 확인하였다. 천연색소 중 현재 가장 각광받고 있는 홍국색소와 비교 시에도 그 감소 수준이 비슷하여 가공식품 소재로서의 이용가능성이 있음을 확인하였다.

제1장 서 론

최근 소비자들의 건강에 대한 인식 고조로 인해 천연색소의 비중이 빠르게 증가하고 있으며 선진국에서는 대부분 천연색소를 이용하고 있다(1). 식품의 색은 관능성을 높여 제품의 가치를 높이며, 소비자의 구매충동과 식욕을 돋우어 주는 중요한 역할을 한다. 때문에 식품회사들은 소비자의 기호성 향상을 목적으로 식품 가공 과정에서 색소를 첨가하고 있다. 식용으로 사용되는 색소는 일반적으로 화학적 합성색소와 천연색소로 구분되는데, 타르색소는 석탄 타르에서 얻는 방향족 탄화수소로부터 합성 제조하는 착색제로 소량으로도 착색 효과를 볼 수 있고 생산이 쉽기 때문에 천연색소보다 상용화 되어 있다(2).

타르색소 중 우리나라에서 사용하는 붉은 계열 색소는 적색 제2호나 적색 제3호, 적색 제40호인데 JECFA(Jiont FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)에 따르면 이는 체내 축적, 갑상선 기능의 문제, 발암성 및 어린아이의 천식이나 주의력 결핍 유발 등의 문제를 야기할 수 있다.

또 다른 합성색소인 아질산나트륨은 대표적인 발색제로서 육색을 고정해줄 뿐만 아니라 항균활성을 가지고 있기 때문에 식육가공품의 보존제 및 발색제로 대표적으로 사용되는 화학물질이다. 그러나 아질산나트륨은 과다 복용시 청색증, 빈혈, 저혈압 등 증상의 원인이 될 뿐만 아니라 식품 속에 잔존하다가 제2급 및 제3급 amine류와 반응하여 위암, 식도암, 간암 등을 유발할 수 있는 nitrosamine을 생성한다(3).

한편, 전통적으로 천연색소는 합성색소에 비해 색상의 선명도가 떨어지고 취급 안정성이 낮아 식품으로의 적용이 제한적이었다. 그러나 최근 소비자의 자연 및 건강 지향성이 두드러지면서 지속적인 연구개발이 진행되어 천연색소의 처방 및 가공기술이 발전하면서 그 격차가 급격히 감소하고 있다(4).

천연색소는 주로 carotenoid, antocyanin, chlorophyll, betalain계 색소, 홍국색소 등이 폭넓게 응용되어 왔으며 식용색소 중에서 적색 색소가 가장 많이 사용되고 있는데, 천연색소 중 적색 색소로는 수용성인 antocyanin, 지용성인 shikonin, 코치닐 등이 사용되고 있다. 천연색소는 합성색소보다 가격이 비싸고

용해성이 나쁘며 열과 빛, pH 등의 환경요인에 의해 안정성이 떨어지는 단점이 있으나 식품에 첨가량을 표시할 필요도 없고 식품에 착색했을 때 색조가 자연스럽고 영양성과 기능성을 부여하는 장점도 있다(5).

천연색소 카로티노이드에 속하는 astaxanthin은 지용성 비타민 E인 알파-토코페롤(α-tocopherol)에 비해 550배 강력한 항산화능을 가지는 물질로, 갑각류, 조류 등의 해양생물에 존재한다. 면역증강, 항산화 및 항암효과, 시력 보호 등 기능성이 입증되면서 의약품, 식품, 화장품 등의 소재로 활용이 기대되고 있는 물질이다. 그러나 현재 astaxanthin은 추출 원료로 새우, 가재 등 갑각류나 파피아로도지마(*Phaffia rhodozyma*)라는 미생물을 이용하는데 생산량이 적고 불순물이 많아 가공식품에 첨가하는 색소로 이용하기에는 가격적인 측면에서 합리적이지 않아 응용이 제한되고 있다(6, 7).

반면 최근 astaxanthin의 원료로 관심이 높아지고 있는 것이 미세조류의 일종인 *Haematococcus pluvialis*이다. *H. pluvialis*는 1.5~3%의 astaxanthin을 함유하고 있어 다른 공급원에 비해 함유량이 높고, 생체 내에서 안정성이 우수하다고 알려져있다. *H. pluvialis*는 광합성 미생물 중의 하나인 녹색 단세포 조류로 우호적 환경에서 녹색의 영양 세포가 안정적으로 성장하다가 활성산소에 의한 산화적 스트레스, 고광도 및 고염도, 고온 등의 배양 조건에 노출 시 자기 보호 기작에 따라 적색의 포낭 세포로 전환하며, astaxanthin을 다량 축적한다고 보고되고 있다(8).

축적한 astaxanthin은 추출 방법에 따라 추출 수율이 크게 달라진다. 현재까지 연구된 astaxanthin 추출 방법으로는 초임계 추출법(9), 효소를 이용하여 추출 수율을 높이는 방법(10), 유기용매를 이용한 추출법(6), microwave를 이용한 추출법(11)등이 연구되었지만 아직 효율적인 추출 방법이 명확하게 정립되지 못한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 *H. pluvialis*로부터 astaxanthin을 효율적으로 추출할 수 있는 최적 방법 및 조건을 확립하기 위해 HPLC와 spectrophotometer를 이용하여 astaxanthin 함량을 측정하였다. 또한, 가공식품 소재로써의 상용화 가능성을 평가하기 위하여 astaxanthin의 산화, 빛, 온도, pH에 대한 안정성을 확인하였다.

제2장 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 연구에 사용된 *H. pluvialis*는 후레이크 헤마토코쿠스(아이슬란드산, 가우스드림)이며, 분쇄한 후 -40℃에서 냉동 보관하며 추출용 시료로 사용하였다. 표준물질 astaxanthin은 sigma aldrich(Korea)에서 구입한 제품을 사용하였다.
추출을 위해 초음파기(SD-300H, MUJIGAE seong dong, Korea)와 Homogenizer(PH91, SMT process homogenizer, JAPAN)를 사용하였으며 추출용매로 증류수와 ethyl alcohol(DAEJUNG, Siheung-si, 99.9%) 및 Acetone(SAMCHUN, Pyeongtaek-si, 99.7%)를 사용하였다. 비누화와 high pressure liquid chromatography(HPLC)분석에 사용된 methyl alcohol, tert-butyl methyl ether, phosphoric acid, chloroform은 모두 삼천화학(Gyeonggi-do, Korea)과 supelco(darmstadt, Germany), Fisher scientific(Seoul, Korea)에서 HPLC grade로 구매하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 추출시료 astaxanthin의 함량 분석

(1) UV-VIS Spectrophotometer

UV-VIS Spectrophotometer(μQuant™ Universal Microplate Spectrophotometer BIO-TEK INSTRUMENTS, USA)를 이용하여 475 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 추출된 astaxanthin의 양을 분석하였다.

(2) HPLC

가) 검량선 제작

astaxanthin 함량 측정을 위해 astaxanthin 표준물질을 methanol로 용해하여 1, 2, 4, 8, 16배로 희석한 뒤 6분대의 peak area값으로 함량을 계산하여 검량선을 제작하였다.

나) 비누화

*H. pluvialis*로부터 추출된 ester형 astaxanthin을 free형 astaxanthin으로 전환시키기 위해 Han(12)의 방법을 변형시켜 *H. pluvialis* 추출물을 비누화처리 하였다. 용매 추출물을 질소농축하여 chloroform 1 mL를 첨가한 후 Methyl alcohol 4 mL를 첨가하여 강하게 교반한다. methanolic 0.1N NaOH 5 mL를 첨가하여 20℃에서 2시간 방치 후 분석하였다.

다) 분석

astaxanthin 함량 측정은 Han(12)의 방법을 변형시켜 측정하였다. HPLC(Waters 2695, Prodigy Scientific, USA)는 Eclipse Plus C18(4.6 x 250 mm, 5 μm)를 이용하고 검출기는 UV/visible 검출기(475 nm)를 사용하였다. 컬럼 온도는 30℃로 유지하였다. 주입량은 10 μL, 유속은 1.0 mL/min, 이동상은 용매 A(MeOH), 용매 B(MTBE), 용매 C(1% phosphoric acid)를 사용하였다. Free astaxanthin과 ester astaxanthin을 분리하기 위하여 A용매는 15분까지 91%, 25분까지 66%, 40분까지 16%로 진행하였다. HPLC 조건 요약은 Table 1에 명시하였다.

Table 1. A High performance liquid chromatography analysis condition for determination of astaxanthin contents. MeOH : Methanol, MTBE : Methyl Tertiary Buthyl Ether.

HPLC analysis system			
Instrument	Waters 2695		
Column	C18 Eclipse Plus 4.6 x 250 mm, 5 μm		
Column temp.	30℃		
Detector	UV/vis detector		
Wavelength	475 nm		
Injection volume	10 μL		
Flow rate	1 mL/min		
Eluent system	A : MeOH, B : MTBE, C: 1% H_3PO_4		
Gradient solution	A	B	C
0~15min	91%	5%	4%
16~25min	66%	30%	4%
26~30min	16%	80%	4%
31~40min	16%	80%	4%

2) 추출 방법

(1) 열수추출

H. pluvialis 분쇄 분말 0.5 g에 3차 증류수 10 mL를 넣어 1시간 동안 초음파(SD-300H, MUJIGAE seong dong, Korea)추출을 진행하였다. 이후 118 KPa 하에서 온도를 조작하여 각각 10분 동안 추출하였다. filter paper(Whatman 2, Cytiva, China)를 이용하여 감압여과한 후 10 mL로 정용하였다.

(2) 용매 추출

H. pluvialis 분쇄 분말 0.5 g에 용매 10 mL를 넣어 1시간 동안 초음파(SD-300H, MUJIGAE)로 추출하였다. 용매는 Ethanol, Acetone, Acetone+Ethanol 혼합액 (1:1, v/v)을 사용하였다. 추출 효율이 가장 좋은 용매를 선정하여 용매 농도와 초음파 추출 시간과 온도를 각각 1시간, 2시간, 3시간, 상온, 50℃, 70℃로 조작하여 추출 최적 조건을 탐색하였다. 이후 homogenizer(PH91, SMT Co. Ltd) 3500 rpm에서 10분 동안 추출하였다. filter paper(Whatman 2)를 이용하여 감압여과한 후 10 mL로 정용하였다.

(3) 아임계 추출

H. pluvialis 분쇄 분말 5 g에 증류수 100 mL를 넣고 아임계(TPR-I, T-04231, Taiatus techno, Japan)를 이용하여 압력 3 MPa, Heater 50V, Motor 150 rpm 조건에서 온도를 80℃, 120℃, 180℃, 210℃로 조작하여 추출하였다. 효율이 가장 좋은 온도를 선택하여 80% Ethyl alcohol로 추출하였다. 추출 후 filter paper(Whatman 2)를 이용하여 감압여과한 후 100 mL로 정용하였다.

(4) 초임계 추출

초임계 추출은 Reyes 등(9)의 방법을 참고하여 진행하였다. 추출조의 압력을 50 MPa, 온도는 40℃로 설정하였다. 분리조의 압력은 4 MPa, 온도는 40℃로 설정하였다. CO_2의 유속은 60 mL/min으로 하여 *H. pluvialis* 분쇄 분말 20 g을 360분 동안 추출하였다.

3) 색소 안정성 평가

빛, 온도, 공기 및 pH에 의한 astaxanthin의 안정성을 검토하였다. astaxanthin 추출물과 홍국 색소 희석액을 8주 동안 보관하면서 빛, 온도, 공기, pH의 영향을 확인하였다. 빛의 영향을 확인하기 위해 일광, 백열등에서 보관하였고, 온도의 영향을 확인하기 위해 50℃, 70℃에서 보관하였다. 공기의 영향을 확인하기 위해 산소, 공기에 노출시켰고, pH3, 5의 조건에서 pH의 영향을 조사하였다. 위의 시료 중에서 빛의 영향을 관찰하는 조건인 일광, 백열등을 제외하고 시료를 호일로 싸서 암소에 보관하였다. 8주간 방치하면서 7일 간격으로 측정하였다. HPLC(Waters 2695, Prodigy Scientific, USA), UV/VIS Spectrophotometer(μQuant™ Universal Microplate Spectrophotometer BIO-TEK INSTRUMENTS, USA)로 분석하여 astaxanthin의 잔존함량을 계산하였다.

3. 통계처리

모든 실험 데이터는 3회 반복 진행하였으며 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 본 연구의 통계처리는 IBM SPSS(ver 28, Chicago, IL, USA)을 이용하여 신뢰수준 95%($p \leq 0.05$)에서 Duncan's multiple range test를 행하였다.

제3장 결과 및 고찰

1. 분석법 확립

1) UV/VIS Spectrophotometer를 이용한 분석

UV-VIS Spectrophotometer를 이용하여 astaxanthin 표준물질을 0.1 μg/μL, 0.05 μg/μL, 0.02 μg/μL, 0.01 μg/μL로 희석한 뒤 scan하여 최적의 스펙트럼을 확인한 결과, λ_{max}는 475 nm라는 것을 확인하였다.(Figure 1) astaxanthin 표준물질을 0.125 μg/μL, 0.0625 μg/μL, 0.0312 μg/μL, 0.0156 μg/μL, 0.0078 μg/μL로 희석한 후 최대흡수파장인 475 nm에서 흡광도를 측정하여 검량 곡선을 작성하였다. 직선성을 검토한 결과 R^2값이 0.9977으로 확인되었다.(Figure 2)

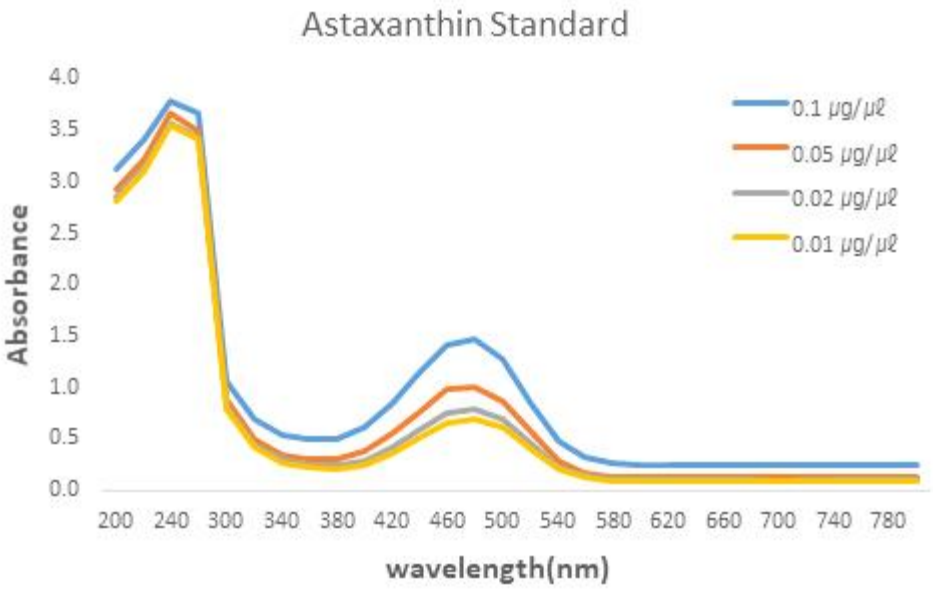


Figure 1. UV-VIS Spectrophotometer λ_{max} of astaxanthin standard.

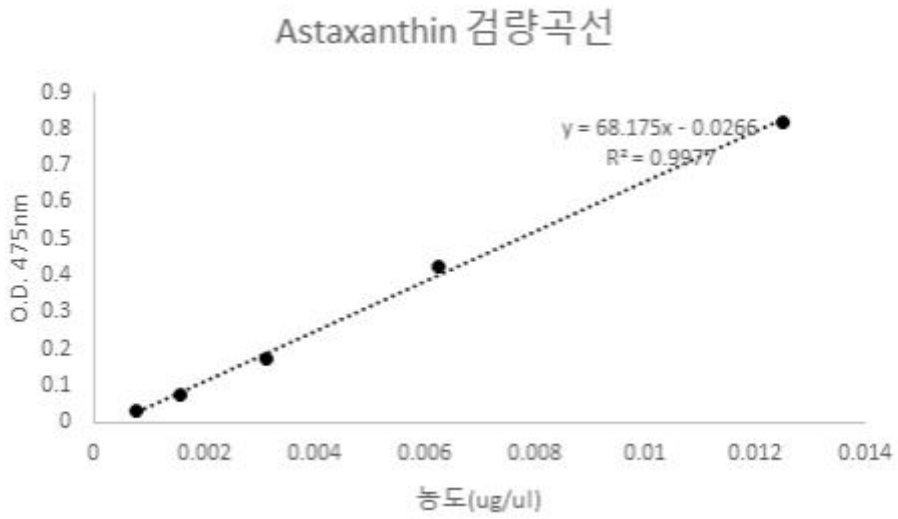


Figure 2. Calibration curve of astaxanthin standard.

2) HPLC를 이용한 분석

H. pluvialis 추출물의 astaxanthin을 분석하기 위해 HPLC 분석조건을 확립하였고 정성, 정량 분석하였다.

(1) Astaxanthin 표준물질 분석

Astaxanthin은 Sigma사의 제품으로 순도 97% 이상을 사용하였다. Astaxanthin을 메탄올 용매에 용해하여 HPLC 피크 분리를 확인하였다. Astaxanthin 표준물질이 6분대에 피크가 검출되는 것을 확인하였다.

(2) *H. pluvialis* 분석

Homogenizer 후 초음파 처리한 *H. pluvialis* 추출물 astaxanthin 함량을 분석하였다. 분석 결과, 위의 표준물질의 결과와 마찬가지로 6분대에 astaxanthin free form을 확인할 수 있었다. 25~35분대의 ester from의 astaxanthin을 다량 함유하고 있어 *H. pluvialis* 추출물을 가수분해처리를 하여 HPLC 분석을 수행하였다. ester 결합을 끊어 free form으로 전환시킨 후 분석하였다. astaxanthin 표준물질과 같은 시간대(RT=6min)의 피크가 신장되는 것을 확인하였다.(Figure 3)

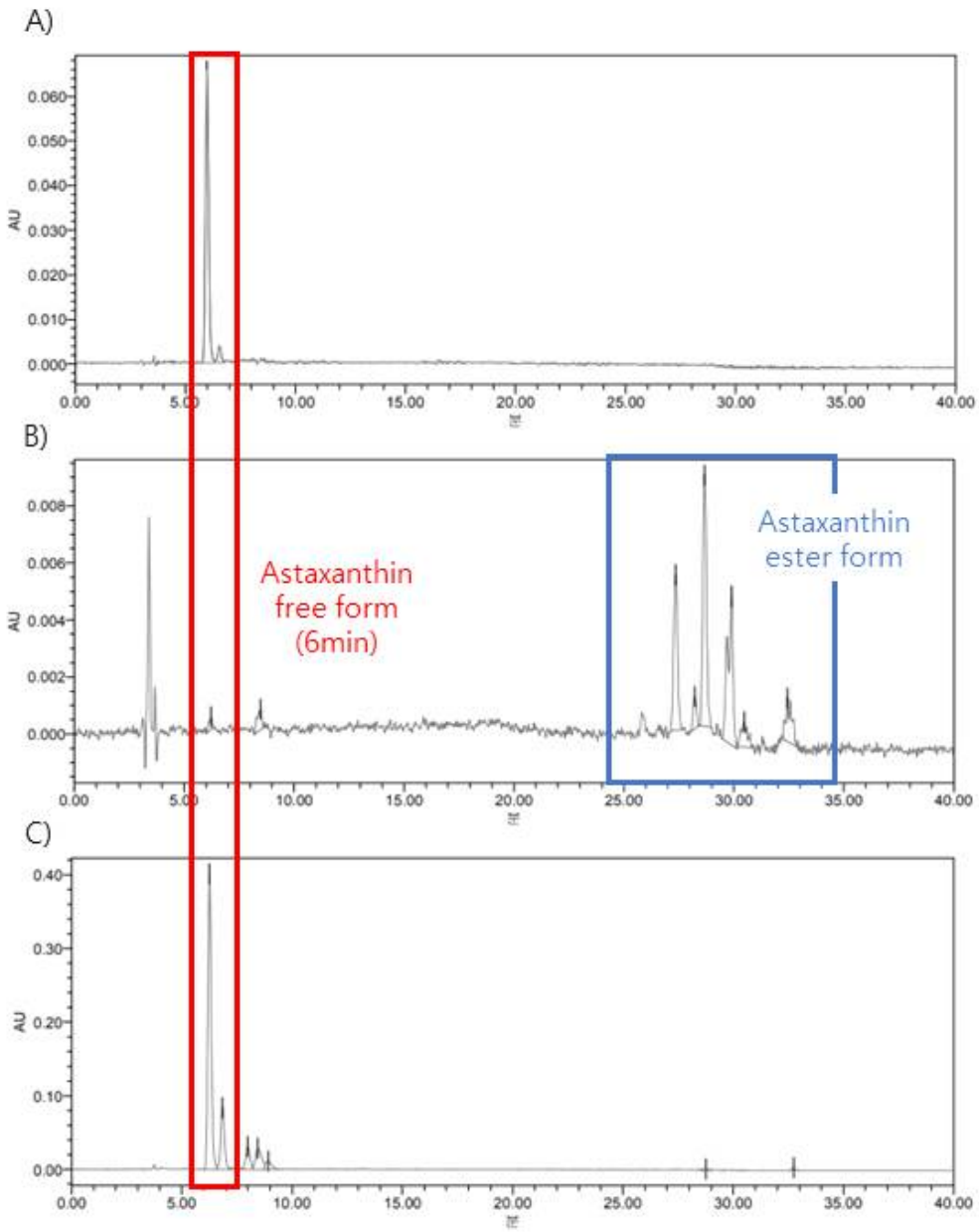


Figure 3. A) HPLC chromatogram of astaxanthin standard solution B) HPLC chromatogram of *H. pluvialis* extraction sample C) HPLC chromatogram of *H. pluvialis* saponification of extract sample

2. 추출 방법 탐색

1) 추출 방법 탐색

*H. pluvialis*의 astaxanthin 최적 추출 방법을 확립하기 위해 열수, 유기용매, 아임계, 초임계 추출 후 UV-Spectrophotometer를 사용하여 OD 475 nm에서 흡광도를 관찰하고 astaxanthin 함량을 비교한 것을 Figrue 4에 나타내었다. 열수, 아임계 추출에 따른 astaxanthin 추출 함량은 현저히 낮은 함량을 보였다.

반면, 현재 시중에 판매되는 제품에 다수 적용되는 방법 중 하나인 초임계를 통한 추출 함량보다 용매 추출이 보다 높은 추출 함량을 보였다. 그 중에서도 EtOH로 추출했을 때 astaxanthin 함량이 108.86 mg/g으로 astaxanthin 추출 함량이 가장 높았다. 최적 조건을 확립시키기 위해 EtOH을 사용해서 추출하되, 시간과 온도에 변화를 주어 추출 후 HPLC로 분석하여 각 조건에 따른 astaxanthin 추출 함량을 비교하였다.

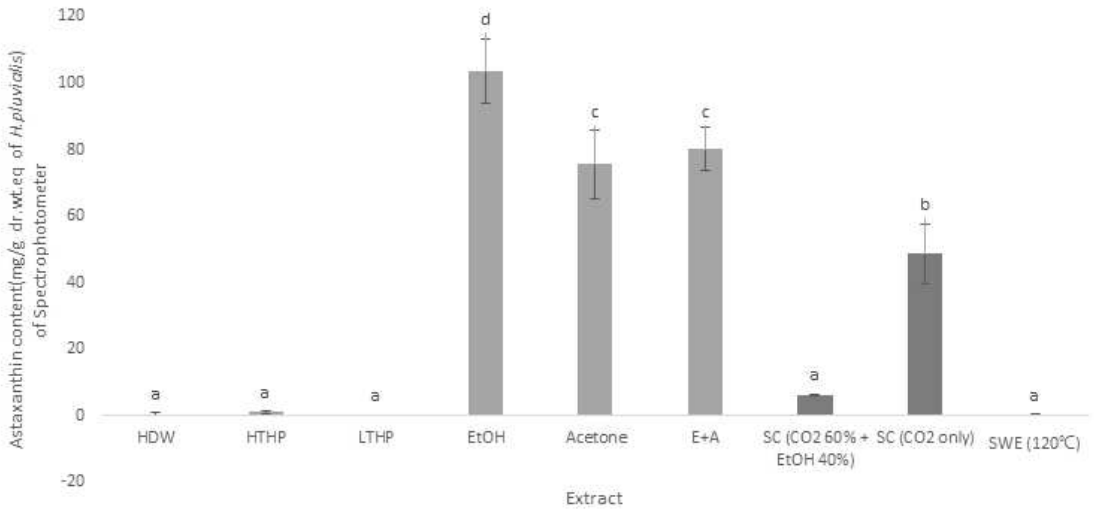


Figure 4. Astaxanthin content of *H. pluvialis* according to extraction method. Extracted according to each method and analyzed with UV-spectrophotometer. (HDW = hot distilled water, HTHP = high-temperature and high-pressure, LTHP = low-temperature and high-pressure, EtOH = ethanol, E+A = ethanol+acetone, SC = super critical, SWE = subcritical water extraction) Results were expressed as the mean ± S.D. Different letters on bars are significantly different among different concentrations by Duncan's multiple range test($p \leq 0.05$)

2) 추출 온도 최적화

*H. pluvialis*의 astaxanthin 최적 추출 온도를 확립하기 위해 추출 시간에 변화를 주어 추출을 진행하였다. 추출 조건은 99.9% Ethanol를 사용하여 1시간 동안 초음파 추출로 설정하였고, 추출 온도는 25℃, 50℃, 70℃로 변화를 주어 추출하였다. 설정 온도에 따라 추출 후 HPLC를 사용하여 분석하고 astaxanthin 추출 함량을 비교한 것을 Figure 5에 나타내었다. Figure 5에 나타낸 바와 같이 온도가 높아질수록 추출 함량이 증가하는 경향을 보였다. 70℃로 추출했을 때 34.49 mg/g의 astaxanthin 추출 함량을 보였으나 각 온도별 추출 효율의 차이가 크지 않아 상온인 25℃가 추출 최적 온도라 판단하였다.

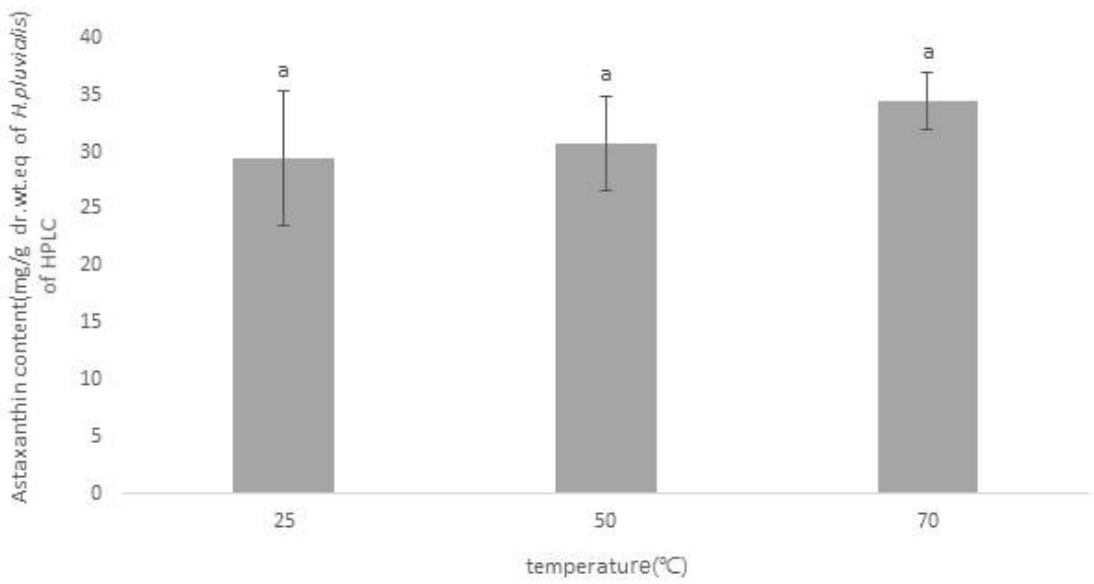


Figure 5. Effect of temperature on the astaxanthin extraction from *H. pluvialis.* The extraction conditions were fixed at 99.% ethanol concentration, extraction time of 1 hour, and ultrasonic extraction. After extraction, analyzed by HPLC to compare astaxanthin content according to extraction temperature.

3) 추출 시간 최적화

*H. pluvialis*의 astaxanthin 최적 추출 시간을 확립하기 위해 추출 시간에 변화를 주어 추출을 진행하였다. 추출 조건은 99.9% Ethanol을 사용하여 25℃에서 초음파 추출로 설정하였고, 추출 시간은 30분, 1시간, 2시간, 3시간으로 변화를 주어 추출하였다. 설정 시간에 따라 추출 후 HPLC를 사용하여 분석하고 astaxanthin 추출 함량을 비교한 것을 Figure 6에 나타내었다. Figure 6에 나타낸 바와 같이 2시간으로 추출했을 때 34.11 mg/g의 astaxanthin 추출 함량을 보여 초음파로 추출할 시 2시간이 추출 최적 시간이라 판단하였다.

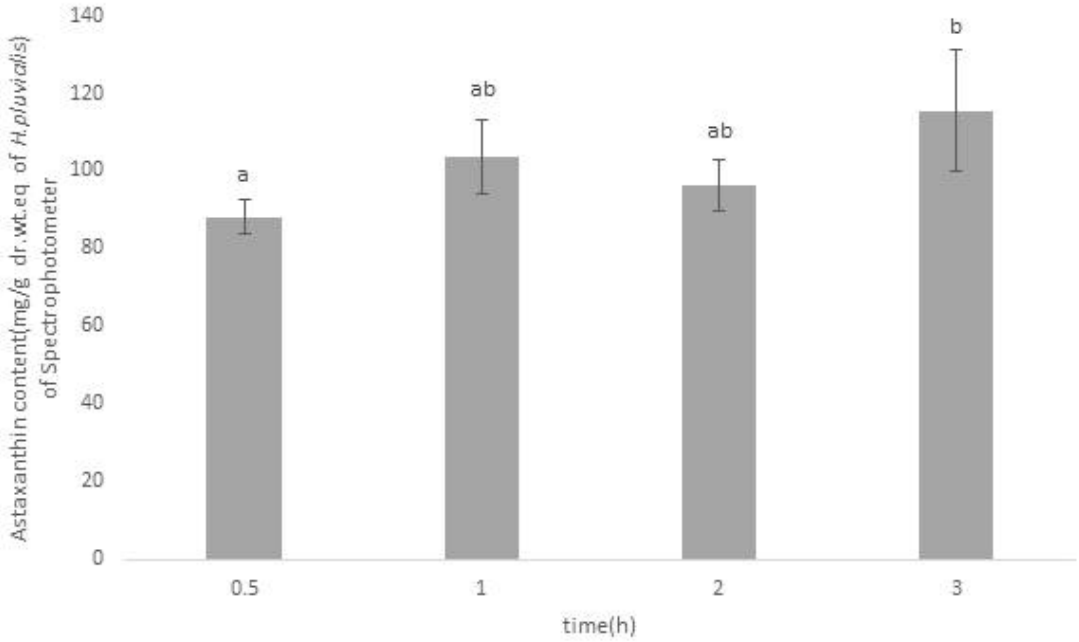


Figure 6. Effect of time on the astaxanthin extraction from *H. pluvialis.* The extraction were fixed at 99.9% ethanol concentration, extraction temperature of 25℃, and ultrasonic extraction. After extraction, analyzed by HPLC to compare astaxanthin content according to extraction time.

4) 추출 조건 확립

항산화 기능으로 잘 알려진 astaxanthin이 99.9% EtOH로 25℃에서 2시간 동안 초음파로 추출했을 때 *H. pluvialis* 건조분말 1 g당 최대 34.11 mg이 추출될 수 있는 것으로 확인되었다. Astaxanthin 원료로 사용하고 있는 새우껍질을 최적의 추출 조건에서 추출했을 경우 astaxanthin 함량이 17.77 μg/g(13)인 것을 고려했을 때 이는 astaxanthin 대량생산의 원료로서 보다 적합하다고 판단할 수 있다. 따라서 *H. pluvialis*를 원료로 이용하여 올리브유, 소세지 등 식품산업의 소재로 다양하게 활용이 가능할 것으로 사료된다.

이러한 *H. pluvialis*를 기존 연구에서 적용되었던 EtOH 추출(14), 초음파 및 글루칸분해효소 처리 추출(15), EtOH 67℃ 추출(16)방법으로 추출할 경우 얻을 수 있는 astaxanthin의 함량은 각각 1.26 mg/g, 22.89 mg/g, 14.64 mg/g이다. 본 연구에서 최적화한 조건으로 astaxanthin을 추출했을 경우 *H. pluvialis* 건조분말 1 g당 astaxanthin을 34.11 mg 얻을 수 있는 점을 고려했을 때, 이는 기존 추출 방법보다 효과적인 추출방법임을 확인할 수 있다.

5) 아임계 추출

아임계 추출 최적 조건을 탐색하기 위해 80℃, 120℃, 180℃, 210℃로 온도를 달리 추출을 진행하였다. HPLC 분석으로 아임계 추출물의 astaxanthin 함량과 추출 수율을 확인하였다.

Figure 7에 나타냈듯이 열수 추출의 온도 조건은 120℃가 추출 수율이 제일 높게 나타났으며 180℃, 210℃에서는 astaxanthin이 전혀 추출되지 않았다. 따라서 열수 추출에서의 최적의 온도는 120℃로 판단되었다.

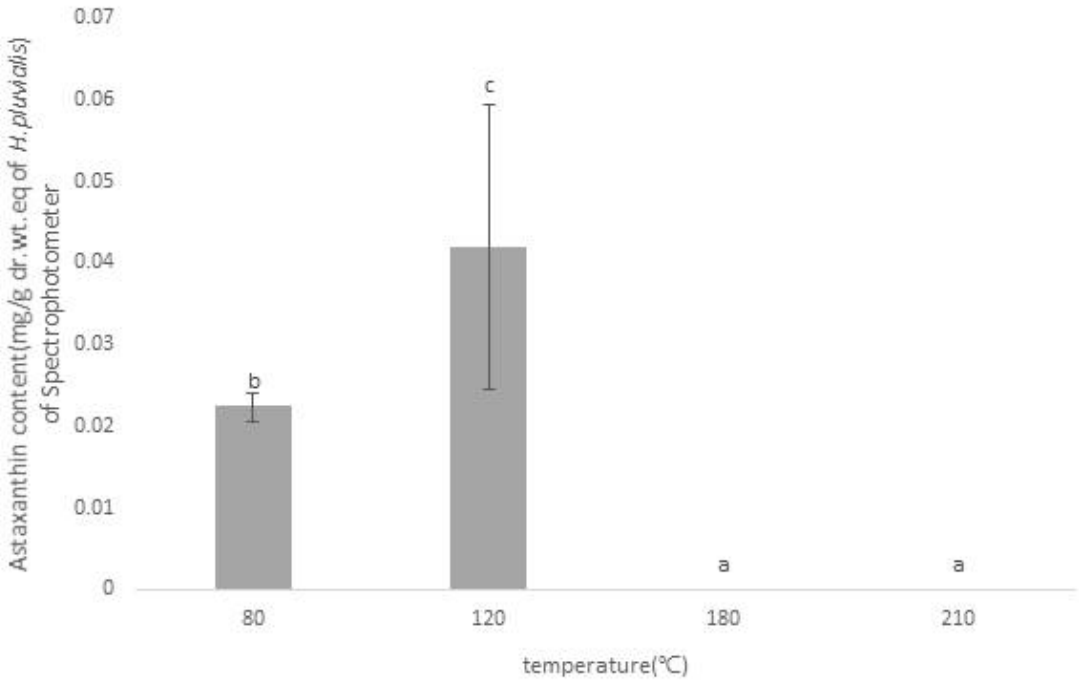


Figure 7. Astaxanthin contents in subcritical water extract of *H. pluvialis* extracted at different temperatures.

6) 초임계 추출

초임계를 이용한 추출물을 HPLC 분석하여 그 함량을 Figure 8에 나타내었다.

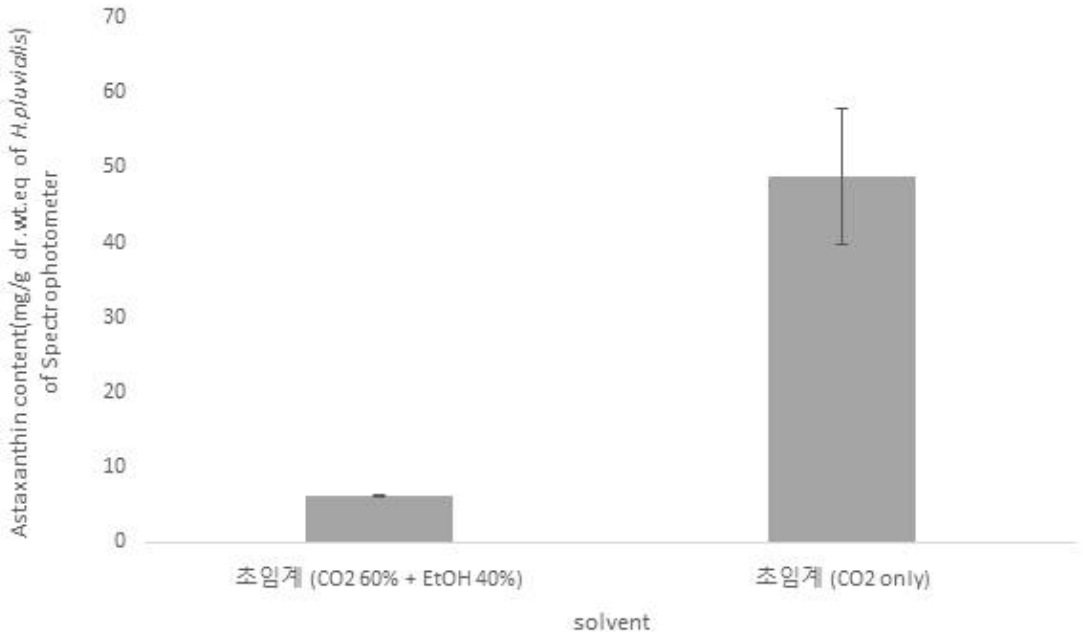


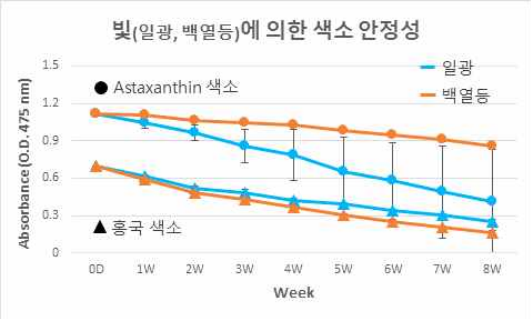
Figure 8. Astaxanthin extraction concentration by supercritical CO_2.

3. 색소 안정성 평가

안정성 확인을 위해 astaxanthin 추출물과 홍국 색소 희석액을 8주 동안 보관하면서 빛, 온도, 공기, pH의 영향을 확인하였다. UV-VIS Spectrophotometer를 통한 astaxanthin의 Total 적색 색소와 잔존함량을 계산하여 안정성을 평가하였다. 실험 결과를 Figure 9에 나타내었다.

일광이나 70℃와 같은 극한 조건에서는 다소 불안정한 추세를 보였으나 다른 변수에 대해서는 비교적 안정한 양상을 보였다. 또한, 현재 식품산업에서 널리 사용되고 있는 홍국 색소와 비교해보았을 때, 홍국 색소와 감소 수준이 비슷한 것으로 보아 astaxanthin 색소도 가공식품소재로서 산업에 적용이 가능하다고 판단하였다.

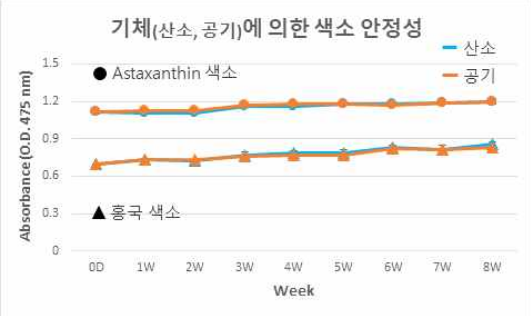
(A)



(B)



(C)



(D)

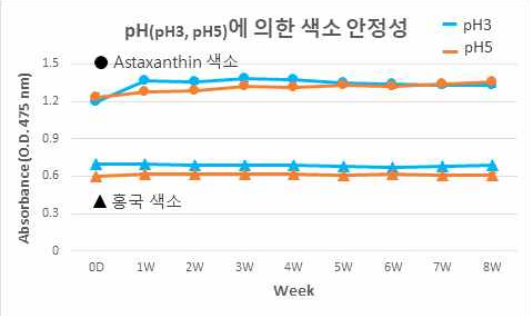


Figure 9. Residual content of astaxanthin extract as measured by UV-VIS Spectrophotometer. (A) light-induced pigment stability (B) Colour stability due to temperature (C) Colour stability depending on the type of gas (D) Colour stability according to pH

제4장 결 론

Astaxanthin은 카르티노이드의 일종으로 항산화 효능을 가진 자연계에 존재하는 천연 붉은 색소이다. astaxanthin은 새우, 게 등의 갑각류를 비롯하여 수생동물에 함유되어있다. 미세조류 중 *H. pluvialis*는 건강식품, 항산화제, 의약품 등의 원료로 활용되는 astaxanthin 생산원료로 현재 각광받고있다.

미세조류 *H. pluvialis*는 astaxanthin을 1~3% 함유하고 있는 천연원료로서 다른 원료에 비해 함량이 높고 생체 내 안정성이 우수하여 효율적인 생산원료로 주목받고 있다. astaxanthin을 다량 함유하고 있는 *H. pluvialis*을 상업화하기 위해 *H. pluvialis* total carotenoid 함량을 측정하여 특성을 분석하고 추출법을 통해 얻은 추출물의 비교, 분석하였다.

H. pluvialis 분말 시료를 열수 추출, 유기용매 추출, 고온고압 추출, 저온고압 추출, 아임계 추출, 초임계 추출 등의 방법으로 추출해본 결과, 유기용매, 특히 Ethanol로 추출했을 때 수율이 좋아 Ethanol 추출 조건으로 추출 수율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

*H. pluvialis*는 기존의 astaxanthin 추출 원료인 갑각류나 파피아 로도지마(*Phaffia rhodozyma*)라는 미생물에 비해 함유량이 많아 astaxanthin 대량생산의 원료로 적합한 소재이다. *H. pluvialis*를 이용하여 astaxanthin의 대량생산이 가능해지면 연어알, 소세지, 육포, 올리브유 등 가공식품에 다양하게 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구는 미세조류의 일종인 *H. pluvialis*로부터 아스타잔틴 추출 수율을 최대화할 수 있는 방법을 탐색하여 식품산업의 소재로써의 가능성을 확인하였다는 점에 의의를 둔다.

참고문헌

1. Kim HG, Kim OD, Lee SJ. Characterization of Natural Gardenia Color with Systhetic Color. The Korean Journal of Food and Nutrition 11(5), 506-512 (1998)

2. Jeon CP, Lee JB, Kwon GS. Stability of Monascus Pigment Produced by Monascus sp. MK2. Journal of Life Science 23, 669-675 (2013)

3. Ha SR, Choi JS, Jin SK. The Physicochemical Properties of Pork Sausages with Red Beet Powder. Journal of Life Science 25, 896-902 (2015)

4. Choe JH, Yeom JH, Bae DG. Utilization of Natural Pigment Resources. Fiber Technology and Industry 13, 113-121 (2009)

5. Heo KC. Production and Utilization of Natural Food Colorant of Shikonin from Lithospermum erythrorhizon Sieb. et Zucc. Ph.D. thesis Mokpo univ., Muan, Korea (2012)

6. Kim SY, Joe EA, Yu JM, In MJ, Chae HJ. Extraction and Analysis of Astaxanthin from Haematococcus pluvialis Using Sonication. The Korean Society of Food Science and Nutrition 37(10), 1363-1368 (2008)

7. Kim SY, Jung SJ, Kim HS, Gam DH, Kim. JW. Optimization of Extraction Conditions for Astaxanthin from Haematococcus pluvialis. KSBB Journal 34, 346-351 (2019)

8. Kim SY, Oh YK, Ha SH. Recovery of Astaxanthin from Microalgae Using Simple and Energy-efficient Method. Korean Chemical Engineering Research 56, 376-380 (2018)

9. Fabián A, Reyes JA, Mendiola EI, José MV. Astaxanthin Extraction from Haematococcus pluvialis using CO2-expanded Ethanol. The Journal of Supercritical Fluids, Volume 92, p75-83, ISSN 0896-8446 (2014)

10. In MJ, Choi JH, Kim, SY, Chae HJ, Kim DH. Enhanced extraction of Astaxanthin from Haematococcus pluvialis using enzyme teatments. Applied Biological Chemistry 51, 247-249 (2008)

11. Kim DK, Han SW, Lee JP, Lee JS, Oh YK. Simultaneous Production of Astaxanthin and Biodiesel from Microalgae. Proceedings of An abstract of the Korean Society for Renewable Energy Academic Conference. p.124-124. (2014)

12. Han SH. Microwave Pretreatment, Extraction and Saponification of Astaxanthin Ester from Haematococcus pluvialis. a Domestic master's thesis Graduate School, Korea University, Seoul (2014)

13. Yoon CH, Bok HS, Choi DG, No GH. Optimization Condition of Astaxatnhin Extract from Shrimp Waste Using Response Surface Methdology. Korean Chemical Engineering Research 50(3), 545-550 (2012)

14. Jeon JY. Studies on the Growth and Antioxidant Activity of

Haematococcus pluvialis, Graduate School of Suncheonhyang University, South Chungcheong Province (2017)

15. Kim SY. Production and stabilization of astaxanthin from Haematococcus pluvialis Ph.D. thesis in Hoseo university, Chungcheongnam-do Province (2006)

16. Antonio M, Juri R, Patrizia C, Antonietta C, Vincenzo L, Simeone C, Despina K, Sanjeet M, Angelo F, Evangelos H, Dino M. Extraction of Astaxanthin from Microalga Haematococcus pluvialis in Red Phase by Using Generally Recognized as Safe Solvents and Accelerated Extraction. Journal of Biotechnology, Volume 283, p.51-61, ISSN 0168-1656 (2018)