

멍게 껍질(*Ascidian shell*)로부터 추출한 천연색소의 안정성에 대한 연구

박신호 · 양재찬[†]

[†]목원대학교 테크노과학대학 생의약화장품학부
(2018년 3월 2일 접수: 2018년 3월 23일 수정: 2018년 3월 27일 채택)

Studies on the Stability of Natural Pigment Extracted from *Ascidian shell*

Sin-Ho Park · Jae-Chan Yang[†]

[†]*Mokwon University, College of Sciences & Technology, Division of Biomedical & Cosmetics,
Doanbuk-ro 88, Seo-gu, Daejeon 302-729, Korea,
(Received March 2, 2018; Revised March 23, 2018; Accepted March 27, 2018)*

요약 : 본 연구는 멍게 껍질을 100.0 % 에탄올 용매로 추출한 후 DMSO로 희석하여 색소안정성을 평가하였다. pH에 따른 흡광도와 색차계 값을 측정된 결과 pH 7.0에서 흡광도와 색도의 $\pm a$ 값이 가장 안정하게 나타났다. pH 3.0에서 흡광도의 감소가 나타났고 색도의 $\pm a$ 값이 감소하여 멍게 껍질 색소는 pH가 중성에 가까울수록 변색방지의 효과가 있을 것으로 판단된다. 항산화제 첨가시 색소의 흡광도가 증가하였으며 α -tocopherol과 Glutathione이 가장 우수한 효과를 나타내었다.

주제어 : 안정성, 멍게, 천연 색소, 항산화제, 카로티노이드

Abstract : In this study, *Ascidian shell* pigment was extracted, first using a 100.0 % ethanol solvent, proceeding with the dilution of it with DMSO (Dimethyl sulfoxide). The extracted pigment was evaluated to verify the stability. The absorbance of light have been evaluated according to pH levels and using the color-difference meter. As a result, it could be seen that absorbance and chromaticity $\pm a$ values were most stable at a pH level of 7.0 By keeping the sample at a pH level of 3.0, it could be observed that the absorbance and the chromaticity $\pm a$ values were decreased. Based on this observation, it can be deduced that the discoloration of the pigment can be prevented if kept at a neutral pH level. When antioxidants were added, the absorbance of the pigment increased, and the best effects could be seen in the α -tocopherol and glutathione samples.

Keywords : stability, *Ascidian shell*, Natural color, antioxidants, carotenoid.

[†]Corresponding author
(E-mail: rabbit@mokwon.ac.kr)

1. 서론

천연색소의 특징으로는 합성색소에 비해 환경에 미치는 영향이 적고 독성이 낮다는 장점만이 아닌 발색이 자연스럽고 우아하며 변색 또는 퇴색이 되어도 색감이 안정적이어서 은은한 색상을 내며 소재의 성질에 따라 다양한 색상을 얻을 수 있다[1]. 또한, 색조의 종류가 많아 다양하게 조합하는 것이 가능하며 가식 가능한 식품 성분이 많아 식품의 착색에 유리하다는 장점이 있다[2]. 그러나 천연색소는 인공합성색소에 비해 가격이 높고 발색력이 떨어지질 뿐만 아니라 생산성, 용해성도 낮으며 열, 빛, pH 등 여러 환경요인에 따라 색소의 안정성이 떨어진다는 단점을 가지고 있어 천연색소 이용 가능성에 대한 연구 또한 활발하게 진행되고 있다[3]. 하지만, 활용 가능한 각종 천연색소의 안정성, 기능성 등에 대한 실증적 연구가 부족한 실정이므로 이에 대한 다양하고 체계적인 연구의 필요성이 있다[4].

멍게는 우리나라, 일본의 북해도 지방 및 일부 아시아국가에서 기호식품으로 회, 염장 및 냉동품 형태로 이용되고 있으며 멍게 껍질을 이용하여 화장품이나 식이섬유 원료로 이용하는 제품 개발 연구가 활발하게 진행 중에 있다[5]. 우리나라에서는 1970년대부터 양식을 시작하여 현재 주요 양식 대상품종으로 취급되어 왔다. 멍게는 분류학상으로 척색동물 (Chordata) 문, 미삭동물 (Urochordata) 아문, 해초 (Ascidiacea) 강, 측성해초 (Pleurogona) 목, 멍게 (Pyuridae) 과에 속한다. 멍게의 외관 표면은 두꺼운 껍질인 피낭 (Tunic)으로 감싸져 있어 피낭류 (Tunicate)라고 불리고 있으며, 몸통은 붉은색 또는 주황색을 띠며 표면에는 돌기가 돌아 있고, 몸통 윗부분에 입수공과 출수공이 있어 이를 통해 각종 유기물과 플랑크톤을 섭취한다[6]. 멍게 껍질에는 알로크산틴(alloxanthin) 31.3 %, 할로신시아크산틴(halocynthiaxanthin) 15.5 %, 아스타산틴(astaxanthin) 7.8 % 등을 비롯하여 약 13종의 카로티노이드(carotenoid) 성분의 색소가 포함되어 있다고 보고된 바 있다[7]. 멍게 껍질의 주요 색소인 카로티노이드계 색소는 동물 및 식물 그리고 미생물 등에 다양한 형태로 분포하며 450nm 근방의 빛을 흡수하는 지용성 색소로써 약 600여 종류가 있으며 노란색, 또는 빨간색 계통으로 분리하거나 카로틴(carotene)류, 잔토틸(xanthophyll)류로 분리할 수 있으며 지용성 색소

로 식품 등에서 천연색소로 이용되고 있다[8].

카로티노이드 색소는 고도불포화(polyene)구조로 되어 있어 빛이나 열에 대한 요소에 민감하다. 저장안정성이 낮기 때문에 실제 산업에 이용하기에는 많은 문제점이 있으나 카로티노이드가 광에너지를 흡수하여 유기물질의 산화적 분해를 방어하거나[9], 어류 와 갑각류에 카로테노프rotein(carotenoprotein)으로써 단백질을 안정화[10]하는 등 많은 생리적 기능을 가지고 있다. 일반적으로 카로티노이드계 색소들은 지용성이므로 물에 잘 녹지 않고 약산 혹은 알칼리에 의해서 퇴색이나 변색되지 않는다. 그러나 분자 속에 공액이중결합(conjugated double bond, $-C=C-C=C-$)이 많이 있어 산화에 의해서 쉽게 파괴되므로 퇴색과 변색이 일어난다. 또 광선에도 민감하여 색의 변화가 일어나는 경우도 많다[11]. 따라서 본 연구에서는 멍게 껍질로부터 추출한 색소성분의 안정성에 대한 실험을 통하여 천연색소로서의 활용가능성 평가와 화장품 응용에 대하여 검토하였다.

2. 실험

2.1. 실험 재료

2.1.1. 시료, 시약 및 기기

본 실험에서 사용한 멍게 껍질은 2017년 3월 대전 유성구 노은동 농수산물 시장에서 제공 받아 용과 껍질을 분리하여 정제수로 세척 후 동결 건조하여 사용하였다. 색소 안정성 실험에 사용된 색차의 차이는 KONICA MINOLTA(Sakai Osaka, Japan)의 색차계 CM-700d으로 측정하여 CM-S100w의 소프트웨어를 이용하여 Hunter 값으로 측정하였고 시험을 위한 모든 흡광도 측정은 Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)사의 ELISA reader를 사용하였다. pH조절을 위한 완충용액 제조에 사용한 시약으로 DC Chemical(seoul, Korea)에서 citric acid는 DUKSAN(iansa, Korea)에서 sodium phosphate를 구입하여 사용하였다. 시료의 일정농도를 희석하기 위해 dimethyl sulfoxide는 DUKSAN에서 구입하여 사용하였다.

2.1.2. 동결 건조

멍게 껍질의 동결건조를 진행하기 위해 대전테

크노파크에서 동결건조기 PVTFD 10R (ilShinBioBase, Korea)를 이용하여 진행하였다. 멍게 껍질을 -45°C 에서 600분 동안 동결 건조시켜 1차적으로 수분을 제거하였고 -25°C 에서 600분 동안 동결 건조시켜 2차적으로 수분을 제거하였다. 상기 2차 동결건조를 거치고 0°C 에서 200분 동안 건조시켜 3차적으로 수분을 제거하고 25°C 에서 추가로 20분 동안 수분을 제거하였다.

2.1.3. 시료 추출

멍게껍질의 색소 추출은 용매추출법으로 추출하여 본 연구에 사용하였다. 카로티노이드를 추출하기 위해 diethyl ether, acetone를 이용해 왔으나 추출 후 잔류 독성이 있기 때문에 ethanol이 추출에 적합한 용매라는 보고와 60°C 에서 열처리를 병행하여 추출하는 방법이 가장 효율적이라는 연구[12]를 참고하여 동결 건조한 멍게껍질을 100% 에탄올을 추출용매로 하여 60°C 에서 24시간 동안 추출하였으며 추출물은 100 μm filter paper(Advantec No.6, 110 mm diameter)로 감압 여과한 후, 농축기(EYELA, N-1000)를 이용하여 50°C 의 조건으로 농축하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. pH에 따른 색소 안정성 평가

색소 안정성에 대한 pH의 영향을 알아보기 위하여 DMSO로 희석 시킨 멍게 껍질 색소 추출물을 macllvaine 완충용액(0.1M citric acid + 0.2M Na_2HPO_4)을 이용해 pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 및 7.0으로 조절하여 10.0% 시료를 제조하고 25°C 에서 빛을 차단한 상태에서 보관하며 24시간 간격으로 7일 동안 micro plate reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.2. 항산화제첨가에 대한 안정성 평가

항산화제에 의한 멍게 색소의 안정성을 평가하기 위하여 DMSO로 희석시킨 멍게 껍질 추출물을 pH 7.0의 macllvaine 완충용액을 이용해 10.0% 시료를 제조하고 α -tocopherol, ascorbic acid, lipoic acid, glutathione을 1000.0ppm 첨가하여 시료를 제조하였다. 제조한 시료들은 암막조건에서 24시간 간격으로 7일간 450nm에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다.

2.2.3. 색도 측정

색의 변화는 색차계를 이용하여 Hunter의 L(lightness)값, $\pm a$ (redness/greenness)값 및 $\pm b$ (yellowness/blueness)값을 3회 반복 측정해서 그 평균값으로 나타내었다. 기기는 L=(99.28), $a=(-0.14)$, $b=(-0.16)$ 인 표준 백색판(standard white plate)으로 보정하여 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. pH에 따른 색소 안정성 평가 결과

멍게 껍질 추출물에서 추출한 색소를 5가지 pH 3.0~7.0에서의 최대 흡수파장을 조사한 결과, pH 3.0에서 463 nm, pH 4.0일 때 464 nm, pH 5.0일 때 464 nm, pH 6.0일 때 463 nm, pH 7.0일 때 463 nm로 나타났다(Fig. 1). 카로티노이드계 색소는 pH에 따라 크게 색깔이 변하지 않지만 산성 및 알칼리성에서는 안정성이 떨어진다.

보고에 따르면 완속된 뚝은감, 연화된 연시로 분리한 카로티노이드 색소용액의 최대흡광도는 각각 461, 462 nm로 멍게 껍질 추출물의 최대흡광도와 유사한 것으로 나타났다[13].

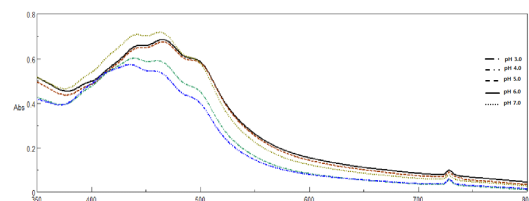


Fig 1. Stability of *Ascidian shell* extracts in different pHs at 350-800 nm.

일주일 간 450 nm에서 pH별 멍게 껍질 색소에 대한 안정성을 관찰한 결과(Fig. 2), pH가 3.0에서 7.0으로 높아질수록 흡광도의 감소가 완만하였다. pH 3.0의 경우 1일차 흡광도 1.0에서 일주일 이후 0.528으로 47.2% 감소하여 경과기간이 길어질수록 급격한 흡광도의 감소가 나타났다. pH 4.0에서 pH 7.0 사이에는 다소 완만한 흡광도를 감소를 나타내었으나 구간 간에 큰 차이는 없었으며 그 중 pH 7.0은 7일차에도 흡광도가 1일차 1.0에서 0.689로 31.1% 감소하여 가장 낮은 감소율을 나타내었다.

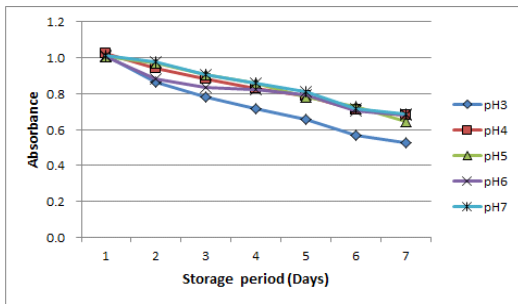


Fig. 2. Stability of *Ascidian shell* extracts in different pHs at 450 nm.

Fig. 3은 색도값의 변화를 비교한 것으로, pH 3.0의 경우 경과기간이 길어질수록 a(적색도)가 감소하고 b(황색도)가 증가하면서 외관상으로 볼 때에 색상이 적색을 띄었던 색소가 황색을 띄는 것을 알 수 있었다. 따라서 멍게 껍질 색소를 함유한 제품의 pH는 중성에 가깝게 유지하는 것이 변색방지에 효과가 있을 것으로 추정된다.

3.2. 항산화제 첨가에 대한 안정성 평가 결과

Fig. 4은 멍게 껍질 색소의 항산화제의 영향에 대한 흡광도 변화이다. 대조군의 경우 흡광도가

1.015에서 7일 후에 0.689로 32.6%의 감소되었다. 대조군의 흡광도가 감소한 이유는 산화에 의한 영향으로 추정할 수 있다. 항산화제 α -tocopherol 첨가군의 경우 흡광도가 1.066에서 7일 후에 1.006, ascorbic acid 첨가군의 경우 0.822에서 0.294로 감소하였으며 lipolic acid 첨가군의 경우 0.868에서 0.512, glutathione 첨가군의 경우 1.016에서 0.769로 각각 6.0, 52.8, 35.6, 24.7%의 감소율을 보여 α -tocopherol 첨가군의 경우 멍게 껍질 색소의 산화를 억제하여 변색 방지 효과가 뛰어난 것으로 나타났다. ascorbic acid 첨가군의 경우 오히려 대조군보다 색소 안정성이 크게 저해하는 것으로 나타났으며 그 다음으로 lipolic acid 첨가군이 색소 안정성 저해를 나타내었다.

Fig. 5에 나타난 색도에서도 α -tocopherol 첨가군의 색도 감소가 대조군과 비슷하게 감소하였고 외관상 색상의 변화가 적었으며 멍게 껍질 색소의 산화를 지연하는 것으로 관찰되었다. lipolic acid와 glutathione 또한 색도의 차이에서 대조군과 큰 변화가 없었으나 ascorbic acid의 경우 대조군보다 색도 감소가 가장 크게 나타나 외관상의 색소의 탈색현상이 분명하여 산화방지 효과를

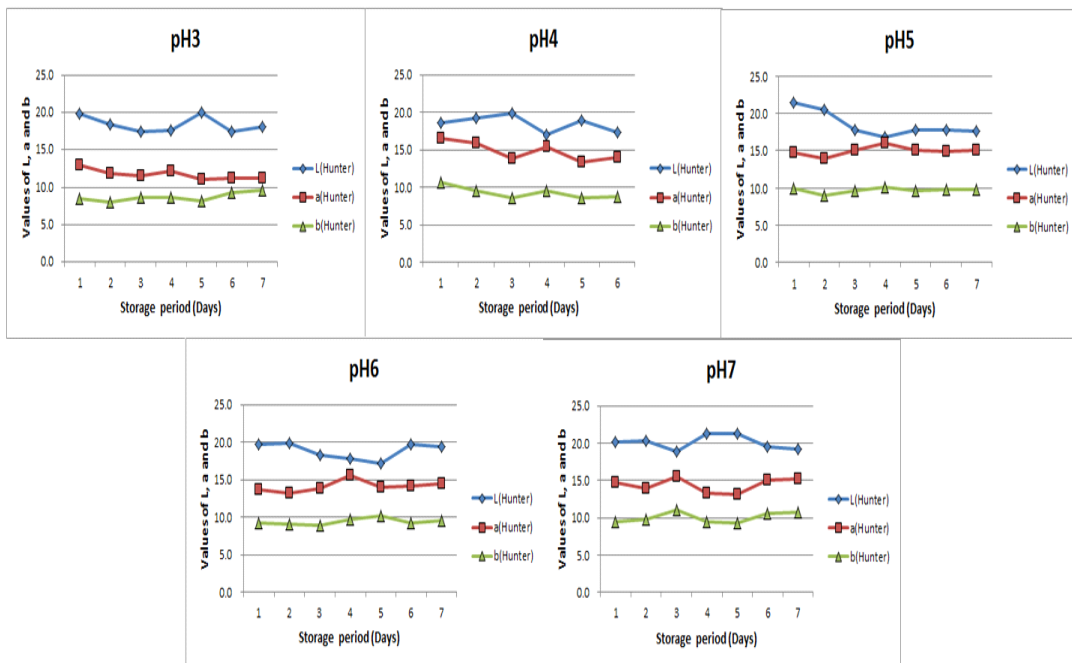


Fig. 3. Hunter L, a and b values of *Ascidian shell* extract at different pHs.

기대하기 어렵다.

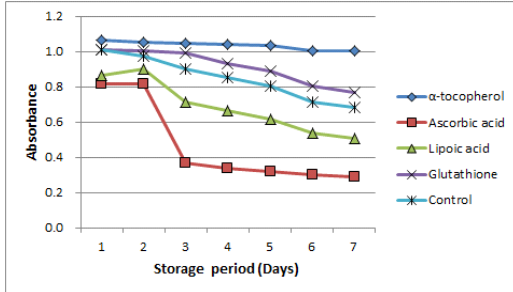


Fig. 4. Absorbance Change of *Ascidian shell* extract with different antioxidants at pH 7.0.

카로티노이드의 산화를 방지하는 방법으로 가열에 의한 효소의 불활성화, 산소 억제, 항산화제의 첨가 등의 방법이 있으며[14] 그 중 항산화제의 효과를 검토한 결과 산화방지제로 널리 사용하는 ascorbic acid가 멍게 껍질 색소에서 안정성을 저해하였으며 그 이유로 ascorbic acid는 환원력에 의한 산화방지 효과가 나타나지만 자체에서 내는 산에 의한 색소의 안정성 저해가 일어난 것

으로 생각된다. 이는 L-ascorbic acid의 경우 항산화제로 식품 및 음료 등에 사용되어 왔으나 조건에 따라 지방산화를 촉진하는 경우가 있으며 색도가 증가되어 항산화 효과를 나타내지 못한다는 보고와 연관성이 있을 것이라 사료된다[15].

4. 결론

본 연구에서는 멍게 껍질 추출물을 이용하여 색소안정성 실험을 통해 천연색소로서의 활용가능성을 평가하였다. pH에 따른 흡광도 변화는 pH 3.0의 감소율이 높았고 시간경과에 따라 흡광도가 점차 감소하는 것을 볼 수 있었으나 pH 7.0에서 흡광도의 감소율이 가장 낮게 나타났으며 색도값 측정결과 pH가 산성인 3.0에 가까워질수록 시간의 경과에 따라 흡광도가 큰 감소를 나타내었고 a값이 감소하는 경향을 보여 색이 노랗게 변하는 현상을 확인할 수 있었다. pH가 7.0인 경우에는 시간경과에 따른 색도값이 일정함을 나타내었다. 따라서 화장품 및 식품의 색소로 사용하는 경우 pH는 7.0 부근을 유지하는 것이 변색방지에 효과적일 것으로 사료된다. 항산화제별

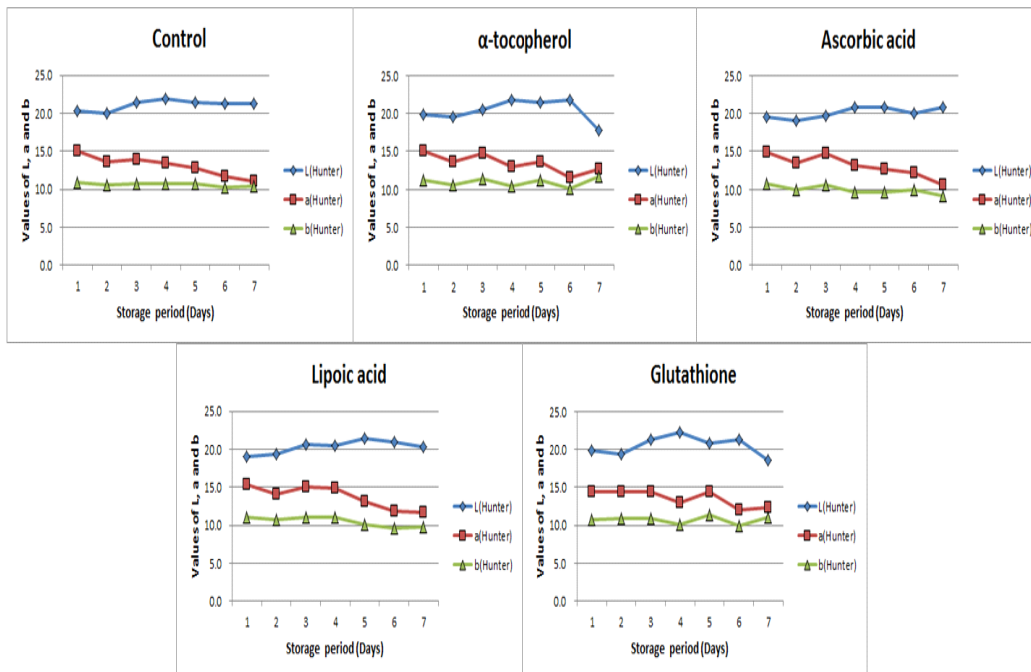


Fig. 5. Hunter L, a and b values of *Ascidian shell* extract with different antioxidants.

명게 껍질 색소의 안정성을 평가한 결과 α -tocopherol과 glutathione에서 산화방지제와 함께 사용하는 것이 색소안정성을 증가시키고 유지할 수 있을 가능성이 높을 것으로 판단되었으며 ascorbic acid의 흡광도와 색도값이 경과기간이 길어짐에 따라 감소가 증가하여 안정성이 낮게 나타났다.

그러나, 카로티노이드는 분자내에 공액 이중결합을 가지고 있어[16] 산소, 온도, 금속 등의 영향을 받아 쉽게 자동산화 되고 선행연구에 따르면 주스에 포함된 카로티노이드가 일광조건에 저장에 따라 파괴가 증가하여 색의 변화현상이 생기는 경우가 있으며 카로티노이드는 일광에 약하며 산화가 촉진되어 안정성에 크게 영향을 준다고 보고하였고[17] 감귤의 카로티노이드의 열에 대한 안정성 실험에서 40°C 이상의 온도에서 변색이 일어난다고 알려져 있다[18]. 이와 같이 천연색소의 빛, 열, 산화 및 금속 등에 의한 안정성의 향상을 위한 문제점을 보완하고 안정성을 확보하기 위하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

References

1. G. J. Lauro, "A primer on natural colors", *Am. Assoc. Cereal Chemists*, Vol.36, No.11, pp. 949-953. (1991).
2. B. R. Park, K. S. Kim, H. R. Park, K. O. Shin, K. M. Ahn and K. Y. Kim, "A study on lip-balm usability from *Lithospermum erthrozon*", *J. Cosmetological Sci*, Vol.6, No.3, pp. 239-247 (2010).
3. Y. H. Kim, S. S. Lee, "A study on pigments from *Rhodospila globiformis* by Acetone Extraction : Stability of Red Pigments", *J. Korean Soc. Food Nutr*, Vol.3, No.1, pp. 25-29 (1994).
4. J. M. Yoon, M. H. Cho, T. R. Hahn, Y. S. Paik, H. H. Yoon, "Physicochemical Stability of Anthocyanins from a Korean Pigmented Rice Variety as Natural Food Colorants", *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL*, Vol.29, No.2, pp. 211-217 (1997).
5. J. K. Song, H. M. Yun, B. D. Choi, M. J. Oh, S. J. Jung, "Isolation of marine birnavirus from ascidian *Halocynthia roretzi*, and its relation with tunic softness syndrome", *J. Fish Pathol*, Vol.22, No.3, pp. 229-237 (2009).
6. B. D. Choi, S. J. Kang, Y. J. Choi, M. G. Youm, K. H. Lee, "Utilization of ascidian (*Halocynthia roretzi*) tunic 3. carotenoid composition of ascidian tunic", *Korean Fish Soc*, Vol.27, No.4, pp. 344-350 (1994).
7. B. Ticar, Z. Rohmah, M. Baterdene, S. H. Park, B. D. Choi, "Evaluation of Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Ascidian Tunic Carotenoids As a Source of Color Cosmetics", *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, Vol.28, No.1, pp. 36-41 (2013).
8. H. J. Yoo, S. T. Jeon, "Dyeing Properties of Yerba Mate Tea on the Fabrics", *Journal of the Korean Society of Clothing and Textiles*, Vol.36, No.4, pp. 412-421 (2012).
9. T. W. Goodwin, "Metabolism, nutrition, and function of carotenoids", *Ann. Rev. Nutr*, Vol.6, pp. 273-297 (1986).
10. P. E. Zagalsky, E. E. Eliopoulos, J. B. Findley, "The architecture of invertebrate carotenoproteins", *Comp Biochem Physiol*, Vol.97, No.1, pp. 1-18 (1990).
11. E. s. Tak, M. W. Bae, S. H. Kang, Y. J. Bae, S. Y. Kang, S. K. Jung, I. K. Hong, "Presentation of Target Color with Extraction Variables in Natural Dyes Extraction", *Appl. Chem. Eng*, Vol.21, No.5, pp. 559-563 (2010).
12. P. k. Park, E. Y. Kim, "Extraction Method of Carotenoids from *Rhodotorula glutinis*", *Korean journal of biotechnology and bioengineering*, Vol.17, No.1, pp. 44-48 (2002).
13. M. J. Kang, K. Y. Yoon, J. H. Seong, K. H. Lee, K. S. Kim, "The Stability of Carotenoid Pigments in Astrigent

- Persimmon(*Diospyros kaki*) Consumed in Korea”, *J East Asian Soc Dietary Life*, Vol.14, No.4, pp. 355–362 (2004).
14. E. S. Song, H. G. Kim, Y. O. Song, Y. S. Jeon, H. S. Cheih, “Effects of Water Activity and Light on the Oxidation of Carrot Carotenoids”, *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL*, Vol.25, No.6, pp. 775–779 (1993).
 15. M. S. John, H. Steven, “Effects of storage temperature and duration on total vitamin C content of canned single-strength grapefruit juice”, *J Agric Food Chem*, Vol.28, No.2, pp. 417–421 (1980).
 16. W. S. Park, H. J. Kim, H. J. Chung, M. S. Chun, “Changes in Carotenoid and Anthocyanin Contents, as well as Antioxidant Activity during Storage of Lettuce”, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, Vol.44, No.9, pp. 1325–1332 (2105).
 17. C. A. Pesek, J. J. Warthesen, “Photodegradation of carotenoids in a vegetable juice system”, *Journal of Food Science*, Vol.52, No.3, pp. 744–746 (2006).
 18. K. H. Shim, N. K. Sung, K. S. Kang, J. S. Choi, C. W. Jang, “Isolation and physicochemical properties of carotenoid pigments from orange peels”, *J Korean Soc Food Nutr*, Vol.23, No.1, pp. 143–149 (1994).