

이스트 *Phaffia rhodozyma* 유래 astaxanthin의 난황착색에 관한 연구

김기하·안길환*·조명행·이상호*·최치만*·조한덕**·이창희**·모인필***

서울대학교 수의과대학·해태식품연구소*

덕상농장**·수의과학연구소***

(1996년 11월 29일 접수)

Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*

Ki-ha Kim, Gil-hwan An*, Myung-haing Cho, Sang-ho Lee*, Chi-man Choi*,
Han-dug Cho**, Chang-hee Lee**, In-pill Moh***

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

Haitai Food Research Institute*·Dug-Sang Farm**·Veterinary Research Institute***

(Received Nov 29, 1996)

Abstract : The red yeast *Phaffia rhodozyma*, which contains astaxanthin(3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione) as its primary carotenoid, was tested as a dietary pigment source for egg yolks of laying hens. When the yeast was fed to laying hens at several concentrations, the intensity of redness in egg yolks was dependent on the yeast concentration in the feed and the deposition period. Addition of *P. rhodozyma* in feed did not cause any visible adverse effect on laying hens.

Key words : egg yolk, pigmentation, *Phaffia rhodozyma*, astaxanthin, carotenoid.

서 론

계란 난황색의 경제적 중요성 때문에 난황 첨가 색소로 천연 또는 합성 carotenoid 이용에 관한 연구가 오래전부터 진행되어왔다¹. 고농도 색소를 가진 난황은 제과·제빵 상품, 곡수류, 마요네즈 등 기타 다른 식품들의 재료로 사용되어왔다. 일반적으로 닭에서 난황색소 침착을 위한 색소의 원료로는 황색 옥수수, alfalfa 등이 사용되어 왔으나 경제적인 이유로 밀, 보리 등으로 대체되기도 하였다. 닭은 장관내 점막(intestinal mu-

cosa)에서 carotene을 비타민 A로 전환시키기도 한다. 천연색소 원료로는 특히 주요한 carotenoid로 lutein을 함유한 황색 옥수수, 금잔화 추출물, alfalfa 등이 연구되어왔고, 적색 합성 색소로는 β -apo-8'-carotenal과 canthaxanthin 등이 있었다². 하지만 이들 적색 색소는 사람들의 일반적인 기호에 맞지 않는 적색을 나타내는 등의 제반 문제점 때문에 제빵 또는 마카로니 상품의 제조시 사용되지 않았다. 이와는 대조적으로 주요한 carotenoid로 astaxanthin을 함유한 yeast *Phaffia rhodozyma*가 양식 연어에서 핑크빛 살색의 극대화를 위

한 효과적인 식품첨가 색소 원료로 알려졌다³. Nelson과 Baptist⁴는 lutein과 혼합하여 바닷가재껍질로부터 얻은 astaxanthin을 메추리 암컷에게 먹었을 때 난황에 색소 침착이 lutein 단독 투여시보다 30-50배 효과적이었다고 보고하였다. 이 이후로 효과적으로 난황에 적절한 색소를 침착시키기 위한 연구가 계속 진행되어왔는데 그 중의 하나로 *P. rhodozyma*로부터 추출한 색소 astaxanthin을 난황색소 침착제로 이용하려는 시도가 그것이다. 그러므로 본 연구는 red yeast *P. rhodozyma*를 해태식품연구소로부터 공급받아 산란계의 사료에 혼합하여 자유급식시켰을 때 색소가 난황에 침착되는 효율과 투여기간에 따라 나타나는 침착 양상을 살펴보고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 실험물질 : 경기도에 소재하는 양계장(덕상농장)에서 건강한 산란계(isa brown, 강남한일) 100수를 기존의 황색 색소가 첨가되지 않은 사료에 적용시킨 뒤 실험계획에 따라 설정된 실험물질 투여 농도에 따라 동물군을 5개로 나누고 각 군당 20마리씩 배치하였다. 실험동물은 철망으로 된 cage에 5마리씩 상온에서 수용하였다. 실험물질은 산란계용 황색 색소 비첨가 가루사료(제일제당)에 해태식품연구소에서 공급받은 yeast *P. rhodozyma*(astaxanthin, 0.4mg/g)를 0, 10, 20, 40 및 60ppm의 농도가 되도록 혼합하여 빛이 투과되지 않는 어둡고 서늘한 장소에 보관하면서 아침, 저녁으로 1일 2회에 나누어 충분한 양을 15일간 공급하였고, 음수는 상수도를 자유급여하였다.

채란 및 분석 : 채란은 매일 오전 8:00-9:00 사이에 각 실험군별로 실시하여 분석 전까지 냉장실(4℃)에 보관하였다. 닭무게는 실험시작일과 그후 실험종료일까지 3일간격으로 측정하였고 계란무게, 난각무게 등은 매일 측정하였다. 난황에 침착된 색소의 농도측정은 다음의 방법에 따라 진행하였다. 계란에서 노른자를 분리하여 wet weight를 측정하고 실험을 위해서 그중 일부를 취한 뒤 나머지 무게를 다시 측정하였다. 무게 측정이 끝나면 dry weight를 측정하기 위해 dry oven에서 건조

시켰다. 충분히 건조되면 1시간 간격으로 3회 dry weight를 측정하여 3회 측정값의 차가 0.01 미만 일 때의 값을 dry weight로 하였다. 취한 노른자에 동량의 물을 첨가하고 vortex를 이용하여 잘 혼합시킨 뒤 혼합액 2ml를 취했다. 2ml의 혼합액내에 acetone 2ml, petroleum ether 2ml를 각각 차례대로 가하여 철저히 섞어준 후 2ml의 NaCl 20%(w/v)을 첨가하여 다시 한번 철저히 혼합시켰다. 이 혼합액을 2,000rpm에서 2분간 원심시켜 깨끗하고 완전하게 층을 분리시킨 후 맨 위층(petroleum ether)을 취하여 그의 부피를 측정하고 474nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 carotenoid 양($\mu\text{g/g sample}$)은 molar extinction coefficient(2,100)를 이용하여 [petroleum ether의 부피(ml) x 흡광도(474nm)]/[0.21 x dry weight(g)]의 계산식을 이용하여 계산하였다.

혈청생화학적 검사 : 실험종료후 실험에 사용한 닭을 실험군별로 2 마리씩 부검할 때 각각 경정맥에서 채혈하여 항응고제 EDTA로 처리한 병에 넣어 분석전까지 4℃에서 보관하였다. 혈청생화학적 검사는 채취한 혈액을 냉장고에 2시간정도 방치한 후 원심분리를 이용하여 혈청을 분리한 후 자동혈청생화학분석기(Hitachi 7150, Japan)를 이용하여 혈청내 albumin(g/dL), alkaline phosphate(U/L), aspartate aminotransferase(AST, U/L), cholesterol(mg/dL), creatinine kinase(U/L), glucose(mg/dL), total protein(g/dL), triglyceride(mg/dL) 등을 측정하였다.

육안적 관찰 : 실험종료후 실험에 사용한 닭을 각 실험군별로 2마리씩 경정맥을 잘라 충분히 방혈시켜 치사시킨 후 색소침착여부 및 그 정도를 알아보기 위하여 난소부위를 포함하여 각 장기들을 관찰하였다.

병리조직학적 관찰 : 방혈 치사후 각 실험군별로 liver, kidney, ovary, oviduct, crop, proventriculus, pancreas, intestine, gizzard 등을 적출하여 10% phosphate buffered formalin solution에서 고정하였다. 고정된 조직은 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀으로 포매하고 4 μm 의 두께로 절편한 후 hematoxyline과 eosin(H&E) 염색하여 광학현미경으로 병리조직학적 변화를 관찰하였다.

결과처리 및 통계처리: 결과는 평균과 표준오차로 나타내었으며 각 농도에서 평균의 유의성 검정은 student-t test로 하였으며, p값이 0.05이하인 것만을 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

결 과

닭무게: 실험시작일과 3일 간격으로 무게를 측정 한 결과 처음에는 1.6-2.0kg이었고 실험종료시에는 1.8-2.2kg으로 약간 증가된 양상을 보여주었다(Fig 1). Control군에서는 실험 10일째부터 유의성있는 무게증가가 있었으나 그 외 모든 실험군내에서는 무게증가에 있어서 유의성이 나타나지 않았다. 각 실험군간 무게증가에도 역시 유의성이 인정되지 않았다.

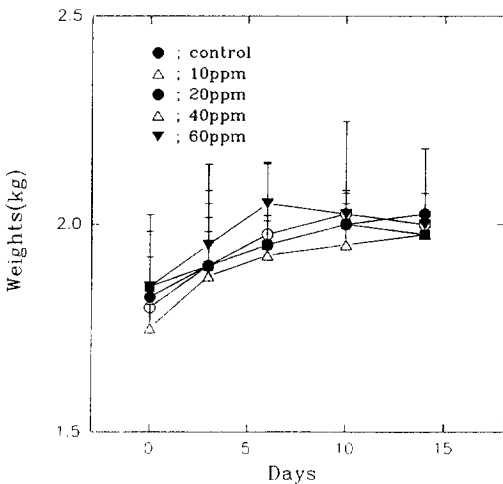


Fig 1. Effect of *P. rhodozyma* on the weight of laying hens. Vertical bars represent S. D. (n=20).

계란무게: 계란무게는 50-70g의 범위내에 분포하였고 전체 실험기간동안 유의성 있는 증가현상은 나타나지 않았다(Fig 2).

난각무게: 난각무게는 6-10g의 범위내에 분포하였고 초기에는 약간의 증가가 있었으나 실험중기부터는 거의 증감이 나타나지 않았다(Fig 3).

색소침착농도: 실험시작 후 3일간은 거의 변화가 없었으나 3일 이후부터는 각 실험군 모두에서 색소침착 농도가 증가하기 시작하였다. 그러나 실험

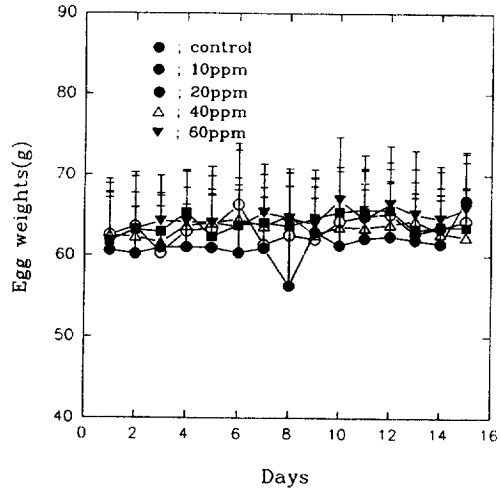


Fig 2. Effect of *P. rhodozyma* in feed on egg weight. Vertical bars represent S. D. (n=4-23).

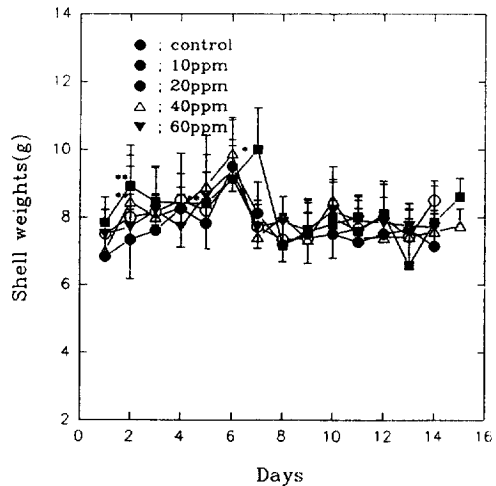


Fig 3. Effect of *P. rhodozyma* in feed on egg shell weight. Vertical bars represent S. D. (n=4-15).
* : Significantly different from control (p<0.05).
** : Significantly different from control (p<0.01).

험 6일부터는 astaxanthin첨가 농도 0, 10 및 20ppm 실험군에서는 감소현상이 나타났고 astaxanthin 40, 60ppm 실험군에서는 약간의 감소를 나타냈지만 다시 초기보다 큰 증가율을 보였다(Fig 4). 각 농도에서 실험종료시 침착된 색소의 농도 평균값을 살펴보면 control군은 18.8, astaxanthin 10ppm 투여군은 31.5, 20ppm투여군은 32.7, 40ppm투여군은 95.8, 60ppm투여군은 122.1(μg carotenoid/g dry

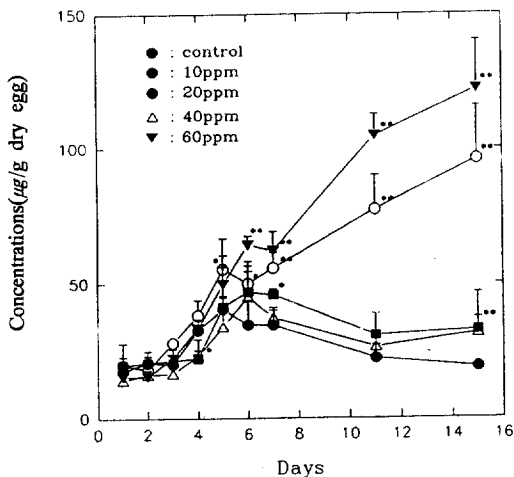


Fig 4. Pigmentaion of egg yolks with *P. rhodozyma*.

Vertical bars represent S.D.(n=4-6)

* : Significantly different from control(p<0.05).

** : Significantly different from control(p<0.01).

egg yolk였다.

Control군은 투여 5일에서 40.6, astaxanthin 10ppm 투여군은 투여 6일에서 45.0, 20ppm투여군은 투여 6일에서 46.9(µg carotenoid/g dry egg yolk)로 15일간 투여기간중 최고침착농도를 나타내었다. 이 결과로 미루어 astaxanthin를 사료내에 첨가하여 투여한 기간에 비례하여 색소가 침착되는 정도로 증가하였으나 저농도(10, 20ppm) 첨가시에는 시간이 증가되어도 최고 침착농도보다 더욱 낮은 침착이 이루어짐을 알 수 있었다.

혈청생화학적 검사 : 혈청생화학적 분석결과는 다음 표(Table 1)와 같았으며 본 실험에서 이용한

닭에서 얻은 혈청화학적 측정값은 정상적인 닭의 혈청생화학적 값의 범위내에 존재하여 이상을 발견하지 못하였다.

부검시 육안적 관찰 : 사료내 색소첨가 농도가 증가할수록 난(ovum)의 색깔이 노란색에서 주황색으로 투여후 약 4-5일째 부터 뚜렷한 적색계의 색소침착현상을 관찰할 수 있었다(Fig 5,6). 그외 다른 부분에서는 색소투여군과 대조군사이에 차이가 없었다.

병리조직학적 관찰 : 부검후 각 실험군별로 적출한 장기 조직표본을 만들어 병리조직학적 관찰을 하였는데 색소를 투여한 실험군과 색소를 투여하지 않은 실험군 사이에 어떠한 병리조직학적인 차이도 관찰할수 없었다(Fig 7, 8).

고 찰

경제적인 중요성 때문에 난황에 천연 또는 합성 carotenoid 이용에 관한 연구가 오래전부터 진행되어 왔는데 astaxanthin을 함유한 yeast *P. rhodozyma*가 양식 연어의 살색에 유용하게 이용되면서 난황의 첨가 색소로 이용하고자하는 연구가 계속 진행되어왔다. Yeast *P. rhodozyma*의 투여시 상태에 따른 난황내 침착정도가 달랐는데 온전한 세포, 파쇄된 red yeast 그리고 *P. rhodozyma*의 기름을 각각 닭에게 하루동안 먹었을 때 파쇄된 yeast와 yeast oil를 먹인 닭의 난황에서만 yeast 색소가 침착되었다. 이 결과는 rainbow trout에서의 실험결과와 일치하였다. 완전한 yeast 세포의 색소는 물고기 근육과 결합되지 않았으나 파쇄된 red yeast 유래 색소

Table 1. Serum biochemical data of laying hens fed astaxanthin

	Test group				
	control	10ppm	20ppm	40ppm	60ppm
Albumin(g/dL)	2.35	2.25	2.4	2.25	2.35
Alkaline phosphate(U/L)	200	405	179.5	143.5	195
AST(U/L)	165	240	250	250	200
Cholesterol(mg/dL)	130	69.5	101	82	105
Creatinine kinase(U/L)	3,950	3,035	4,435	2,525	4,340
Glucose(mg/dL)	224.5	240.5	234.5	284	231
Total protein(g/dL)	5.8	4.4	4.85	5.0	5.35
Triglyceride(mg/dL)	1,965	615	1,425	780	995

는 빨리 축적되었다³. 상기의 이유로 인하여 색소침착을 위하여 red yeast를 포함한 사료를 급여한 닭 실험에서 파쇄된 yeast가 사용되었다.

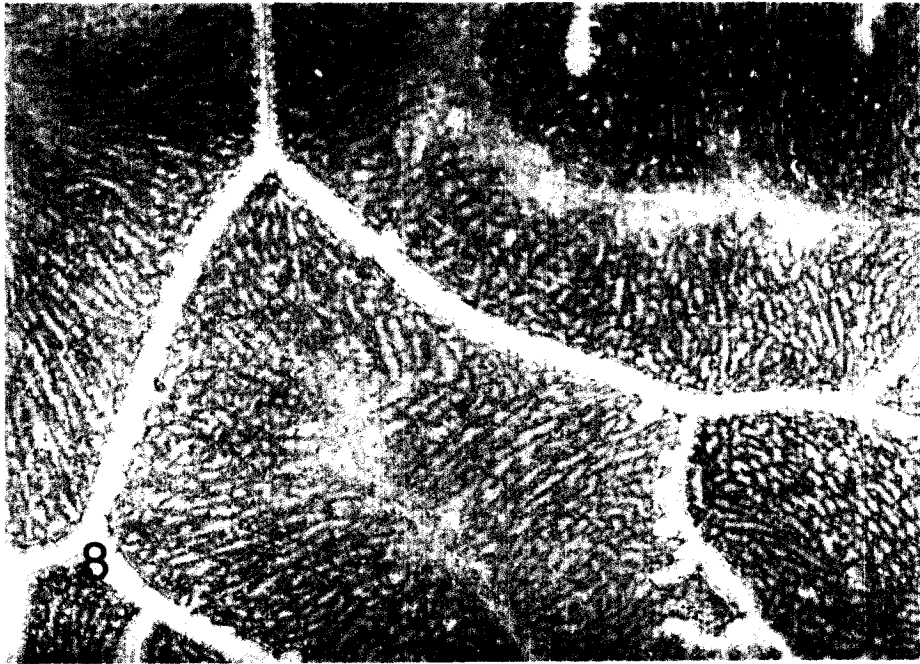
Johnson 등⁵은 닭의 난황내에 *P. rhodozyma*를 이용한 색소침착 실험에서 낮은 농도의 색소를 첨가한 사료를 먹었을 때 난황내 총 carotenoid 함량이 감소함을 보고하였다. 난황에서 축적된 carotenoid 함량은 섭취한 carotenoid 함량의 결과였고 금잔화 추출물을 먹었을 때보다 *P. rhodozyma* 또는 corn을 먹인 메추리 난황에 더욱 효과적으로 축적되었다. 본 실험에서는 *P. rhodozyma*를 사료내에 혼합하여 자유급식시켰는데 색소가 난황에 침착되는 정도는 사료내에 첨가된 색소의 농도에 비례하여 증가되었고, 색소 침착시기는 투여 색소의 농도에 따른 실험군별로 차이가 있었으나 일반적으로 특히 astaxanthin 40과 60ppm 투여군에서 투여일수가 증가함에 따라 침착정도가 증가함을 관찰할 수 있었다. 또한 *P. rhodozyma*를 이용하여 색소침착을 유도하였을 때 투여농도에 따라 다르기는 하지만 투여 4-5일부터 육안적으로 색깔 구별이 명확할 정도로 색소침착 정도가 양호함을 알 수 있었다.

*Yeast Phaffia rhodozyma*로부터 추출한 적색 색소 astaxanthin을 산란계의 사료에 혼합하여 자유급식시켰을 때 육안적으로 쉽게 구별할 수 있을 정도로 난황에 색소침착은 잘 이루어졌다. 색소가 난황에 침착되는 정도는 사료내에 첨가된 색소의 농도에 비례하여 증가되었고, 색소 침착시기는 투여색소의 농도에 따른 실험군별로 차이가 있었으나 일반적으로 투여일수가 증가함에 따라 침착정도가 증가하였는데 투여 3일까지는 색소침착이 이루어지지 않다가 투여 4일부터 증가하는 경향이 나타났다. Astaxanthin 10, 20ppm 투여군에서는 어느 정도까지 색소가 난황에 침착되다가 그 이상의 큰 증가는 실험종료시까지 없었고 astaxanthin 40, 60ppm 투여군에서는 투여기간이 증가할수록 난황에 색소가 침착되는 정도가 증가하였다. 15일간 색소를 첨가한 사료를 투여한 닭에서 실시한 병리조직학적, 육안적 관찰에서 특이한 병변이 나타나지 않아 안전한 물질임을 알 수 있었다. 장기간 yeast를 투여하여 난황에 색소를 침착시켜 이를 식품 등에 이용하고자 한다면 전반적인 독성평가시험이 실시되어야 할 것으로 사료된다.

Legends for figures

- Fig 5. External appearance of abdomen of laying hen fed astaxanthin 20ppm. Comparison of ovum color between control(arrow) and astaxanthin 20ppm group.
- Fig 6. External appearance of abdomen of laying hen fed astaxanthin 60ppm. Comparison of ovum color between control(arrow) and astaxanthin 60ppm group.
- Fig 7. Histopathological analysis of the hen ovary given astaxanthin 60ppm, showing a normal status(H&E, x100).
- Fig 8. Histopathological analysis of the hen oviduct given astaxanthin 60ppm, showing a normal status(H&E, x100).





참 고 문 헌

1. Bauernfeind JC, Brubacher GB, Klaui HM, et al. Use of carotenoids. pp. 743~770, O. Isler, ed. Birkhauser Verlag, Basel, Stuttgart, 1971.
 2. Fletcher DL, Harms RH, Janky DM. Yolk color characteristics, xanthophyll availability, and a model system for predicting egg yolk color using β -apo-8'-carotenal and canthaxanthin. *Poultry Sci*, 57 : 624~629, 1978.
 3. Johnson EA, Conklin DE, Lewis MJ. The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. *J Fish Res Board Can*, 34 : 2417~2421, 1977.
 4. Nelson TS, Baptist JN. Feed pigments. 2. The influence of feeding single and combined sources of red and yellow pigments on egg yolk color. *Poultry Sci*, 47 : 924~931, 1988.
 5. Johnson EA, Lewis MJ, Grau CR. Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma* *Poultry Sci*, 59 : 1777~1782, 1980.
-