

## 초음파처리를 이용한 *Haematococcus pluvialis*로부터의 아스타잔틴의 추출 및 분석

- 연구노트 -

김소영<sup>1,2</sup> · 조은아<sup>1</sup> · 유지민<sup>1</sup> · 인만진<sup>3</sup> · 채희정<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>호서대학교 식품생물공학과, 식품기능안전연구센터

<sup>2</sup>SGM바이오텍(주)

<sup>3</sup>청운대학교 식품영양학과

### Extraction and Analysis of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* Using Sonication

Soyoung Kim<sup>1,2</sup>, Eunah Cho<sup>1</sup>, Jimin Yoo<sup>1</sup>, Man-Jin In<sup>3</sup>, and Hee Jeong Chae<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food and Biotechnology, Center for Food Function and Safety, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

<sup>2</sup>SGM Biotech Co., Ltd, Asan 336-795, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongseong 350-701, Korea

#### Abstract

The extraction and quantitative analysis conditions for astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, and the structural characteristics of *H. pluvialis* extract, *H. pluvialis* hydrolysate and synthetic astaxanthin were investigated using UV/visible and FT-IR spectrometers. Astaxanthin was dissolved in methanol, and then treated to enhance the solubility by sonication for 45 min. With sonication pretreatment, the solubility of astaxanthin increased up to 1.5 times compared to that without sonication. The extracts were hydrolyzed by cholesterol esterase for the analysis of *H. pluvialis* extract containing astaxanthin ester. A HPLC method using reverse phase C18 column with methanol-water (95:5, v/v) as mobile phase was developed to analyze astaxanthin. After hydrolysis, the absorption spectrum of *H. pluvialis* hydrolysate was changed to similar pattern to synthetic astaxanthin, confirming the extraction and analysis condition of astaxanthin from *H. pluvialis*.

**Key words:** astaxanthin, *Haematococcus pluvialis*, HPLC analysis

#### 서 론

최근 식생활 수준의 향상과 더불어 생활환경에 의해 체내에 활성산소가 점차 증가하고 있는 추세이고, 이러한 활성산소는 노화 진행의 가속화와 함께 각종 질병을 유발하는 원인이 된다. 또한 노화억제와 질병치료에 영향을 미치는 기능성 식품과 천연물에 대한 관심이 높아지며, 항산화 물질에 대한 관심이 증가되고 있다. 그 중 지용성 비타민 E인 알파-토코페롤( $\alpha$ -tocopherol)에 비하여 항산화력이 550배에 해당하는 강력한 항산화 물질인 아스타잔틴(astaxanthin, 3,3'-dihydroxy- $\beta,\beta'$ -carotene-4,4'-dione)은 갑각류, 조류 등의 해양생물에 존재하는 케토-카로티노이드(keto-carotenoid)로서 베타-카로틴( $\beta$ -carotene)과 매우 유사한 구조를 지니고 있다(1). 이 물질은 면역증강(2), 항암효과(3,4), 시력보호(5) 등 여러 가지 다양한 기능성이 입증되면서 의약품이나 화장품, 식품 등의 소재로 활용이 기대되고 있는 물질이다.

아스타잔틴의 천연 공급원으로는 게, 새우 등의 갑각류나 효모, 해양생물이 있다. 갑각류(게, 새우)에서 추출된 아스타잔틴은 추출이 용이한 장점은 있으나 높은 회분과 키틴 함량으로 사용이 제한되고 있다(6). 효모인 *Phaffia rhodozyma*는 소량의 아스타잔틴을 함유하고 생체 이용률이 낮은 3R, 3'R form만을 생산하여 현재 식품으로 사용이 금지되어 있고 동물사료로만 활용되고 있는 실정이다(7-9). *Haematococcus pluvialis*는 새로이 주목되고 있는 아스타잔틴의 생산원료로서, 헤마토코커스는 아스타잔틴의 함량이 1.5~3% 수준으로 다른 공급원에 비해 높은 함량을 지니고 있고, 생체 내에서 안정한 에스터(ester)형태의 아스타잔틴을 95% 이상 생산한다. 또한, 생체 이용률이 높은 이성체인 3S, 3'S isomer를 생산하여 상업화 가능성이 높은 공급원이다(10-12).

헤마토코커스는 광합성 미생물 중의 하나인 녹색 단세포조류(unicellular green algae)로 외부 성장 환경에 따라 크게 두 가지 형태, 즉 두개의 편모를 가지고 유행하는 녹색의

\*Corresponding author. E-mail: hjchae@hoseo.edu  
Phone: 82-41-540-5642, Fax: 82-41-532-5640

영양 세포 형태(green vegetative cells)와 이동성이 없는 적색의 휴면 포낭 세포 형태(red cyst cells)로 나뉜다. 우호적 환경에서 녹색의 영양 세포가 안정적으로 성장하다가 여러 가지 외부 환경 조건 변화에 따라 발생하는 비우호적 환경에 노출 시 녹색의 세포들은 자기 보호 기작에 따라 적색의 포낭 세포로 전환하며, 적색의 휴면단계에서 아스타잔틴을 다량 축적한다(13,14).

기존에 아스타잔틴 등의 카로테노이드류의 함량을 분석하는 방법으로는 분광광도법을 이용한 방법과 HPLC를 이용한 방법이 알려져 있다(6). 분광광도법은 분석은 간단하지만 다른 카로테노이드까지 함께 분석되기 때문에 총 카로테노이드 함량 분석 시 주로 이용되고, 정확한 아스타잔틴의 함량 산출을 위해서는 HPLC 방법이 많이 이용되고 있다. 그러나, 헤마토코커스 추출물의 HPLC 분석 시, 헤마토코커스 추출물은 에스터 형태의 아스타잔틴을 다량 함유하고 있어 일반적인 분석시스템(역상칼럼, UV/visible 검출기)으로는 검출에 어려움이 있다. 따라서 헤마토코커스에서 추출된 아스타잔틴은 효소처리나 염기성 용매를 이용하여 에스터 결합을 제거시킨 후 정량하는 방법이 알려져 있다(15-19).

본 연구에서는 *H. pluvialis* cracked cell로부터 추출된 아스타잔틴의 함량 분석을 위해 HPLC 분석방법을 확립하였고, UV/visible 및 FT-IR 분광분석법을 이용하여 분광학적으로 헤마토코커스 추출물과 합성 아스타잔틴의 구조를 비교 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

합성 아스타잔틴(astaxanthin)은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 제품으로서 순도가 92% 이상인 것을 사용하였다. 아스타잔틴의 추출원료인 *Haematococcus pluvialis* cracked cell은 순도 15%의 Parry Nutraceutical사(Pudukkottai, India)의 제품을 사용하였고, 비교를 위해 사용한 *Phaffia rhodozyma* 추출물은 아스타잔틴의 순도가 0.8%인 Astaxanthin Partners사(Yorkshire, UK)의 제품을 구입하였다. Cholesterol esterase는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 메탄올(methanol), 증류수, 아세토나이트릴(acetonitrile)은 Burdick & Jackson사(Muskegon, MI, USA)의 제품으로 모두 HPLC급을 사용하였다. 그 밖의 모든 시약은 1급 이상의 것을 사용하였으며 실험에 사용된 모든 증류수는 3차 증류수를 이용하였다.

### 초음파처리에 의한 아스타잔틴의 추출조건

0.05 M 인산완충용액(pH 5~7)에 헤마토코커스 분말을 0.5%(w/v)의 비율로 현탁시킨 후, 40°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후, 원심분리로 침전물을 회수하여 아세톤을 0.5%(w/v)의 농도로 첨가한 후 초음파처리(75 min,

40 kHz; Power sonic 510, Hwashin, Korea)하여 아스타잔틴을 추출하였다.

### 추출물의 가수분해 전처리 조건

헤마토코커스로부터 추출된 에스터형 아스타잔틴을 유리상태의 아스타잔틴으로 전환시키기 위해 헤마토코커스 추출물을 다음과 같이 효소처리 하였고, 이를 헤마토코커스 가수분해물(*H. pluvialis* hydrolysate)라고 명명하였다. 용매 추출물 1.5 mL를 취하여 2 mL의 0.05 M Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)과 혼합하여 37°C에서 2분 동안 예열시킨 후, cholesterol esterase(1.7~6.8 unit/mL, 0.05 M Tris-HCl 완충용액, pH 7.0) 0.5 mL를 첨가하여 37°C로 조절된 항온수조에서 30~90분까지 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 무수황산나트륨(anhydrous sodium sulfate, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.44 g과 석유에테르(petroleum ether) 4 mL를 첨가하여 30초 동안 강하게 교반한 후 원심분리(3200 rpm, 10 min)하여 석유에테르 층을 회수하였다. 회수된 층을 새로운 시험관으로 옮겨 용매를 휘발시킨 후, 메탄올에 용해시켜 HPLC 분석에 사용하였다(15,16).

### HPLC 분석조건

HPLC 시스템(Agilent 1100, Agilent Technologies Inc., CA, USA)을 이용하여 컬럼은 Apollo C18(5 μ, 4.6×250 mm, Alltech Associates, IL, USA), 검출기는 UV/visible 검출기(474 nm)를 사용하여 유속 1 mL/min로 하고 컬럼온도 온도는 40°C에서, 이동상으로는 메탄올과 증류수를 95:5의 비율로 혼합한 용매를 사용하여 분석하였다. 시료는 메탄올에 용해하여 초음파처리(45 min, 40 kHz; Power sonic 510, Hwashin, Korea)를 한 후, 분석에 사용하였다. 상대 용해도(relative solubility)는 45분간 초음파 처리한 시료의 피크의 면적을 100으로 하여 상대적 세기(%)로 환산하여 나타내었다.

### 분광학적 분석

UV/visible spectrophotometer(Cary 100 Conc, Varian, CA, USA)를 이용하여 실온에서 600~350 nm의 파장에서 흡광스펙트럼을 측정하였고, FT-IR spectrometer(Spectrum GX, Perkin Elmer, CT, USA)를 사용하여 실온에서 4000~400 cm<sup>-1</sup>에서 스펙트럼을 측정하여 구조를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 헤마토코커스 아스타잔틴의 추출·분석 조건

합성 아스타잔틴과 헤마토코커스 추출물(*H. pluvialis* extract)의 아스타잔틴 함량을 분석하기 위해 HPLC 분석조건을 확립하였다. 합성 아스타잔틴을 메탄올에 용해하여 단순히 교반한 후 HPLC 분석을 한 결과 HPLC 크로마토그램 상 피크면적이 작아 정량분석에 어려움이 있었으며 합성 아

스타잔틴의 용해도 향상을 위해 용매(아세트나이트릴, 클로로포름, 헥산, 메탄올)와 용해 조건(교반, 초음파 처리)을 변경하여 실험하였다. 용매로서는 메탄올을 사용하였을 경우 HPLC 크로마토그램상 명확히 피크분리가 일어나는 것을 확인하였고, 용해조건은 용매에 넣고 단순히 교반하는 것보다 초음파처리를 하는 것이 용해가 잘 이루어지는 것을 알 수 있었다. 교반은 4시간 이상 실시하여도 초음파처리와 비교하여 크게 용해율이 증가하지 않음을 확인하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 45분 정도 초음파처리를 했을 때 교반 시간을 길게 하는 것보다 아스타잔틴이 최대한 메탄올에 용해되는 것으로 나타났고, 향후 HPLC 분석에 사용한 모든 아스타잔틴 시료는 45분 동안 40 kHz의 조건에서 초음파처리를 통해 메탄올에 용해한 후 사용하였다.

헤마토코쿠스 추출물의 HPLC 분석 시, 헤마토코쿠스 추출물은 에스터 형태의 아스타잔틴을 다량 함유하고 있어 본 연구에서 사용한 분석시스템(역상칼럼, UV/visible 검출기)으로는 검출에 어려움이 있었다. 기존의 보고된 연구결과에서도 헤마토코쿠스에서 추출된 아스타잔틴은 cholesterol esterase 효소처리나 염기성 용매를 이용하여 에스터 결합

을 제거하고 HPLC 분석을 수행하였을 때 아스타잔틴이 검출되는 것으로 보고되었다(15-19). 본 연구에서는 cholesterol esterase를 이용해 헤마토코쿠스 추출물을 가수분해처리를 하여 조제한 헤마토코쿠스 가수분해물(*H. pluvialis* hydrolysate)의 HPLC 분석을 수행하였다. 가수분해 시 cholesterol esterase의 최적 반응비와 시간을 확인하기 위해 1.7~6.8 unit/mL의 농도에서 30~90분까지 반응시켜 분석한 결과 3.4~6.8 unit/mL의 농도에서는 큰 차이를 나타내지 않았고, 45~90분간 반응 시에도 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 따라서 헤마토코쿠스 추출물을 가수분해 처리 시 cholesterol esterase의 3.4 unit/mL를 첨가하고 45분간 반응시킨 후 분석하였다. 헤마토코쿠스 추출물을 cholesterol esterase를 이용해 에스터 결합을 끊어 유리 아스타잔틴으로 전환시킨 후 분석 시 표준물질인 합성 아스타잔틴과 같은

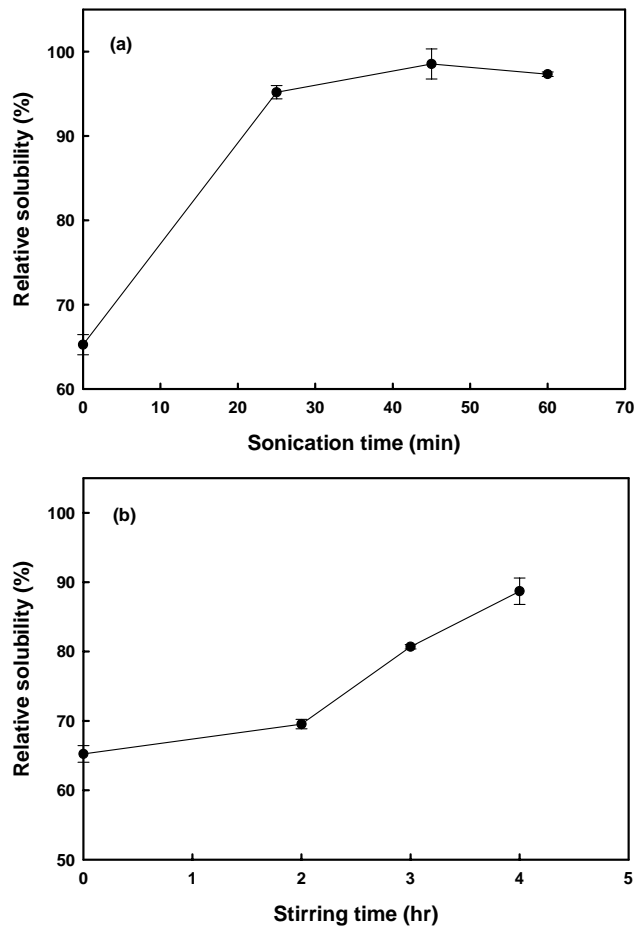


Fig. 1. Effects of sonication (a) and stirring (b) for the pretreatment of astaxanthin sample.

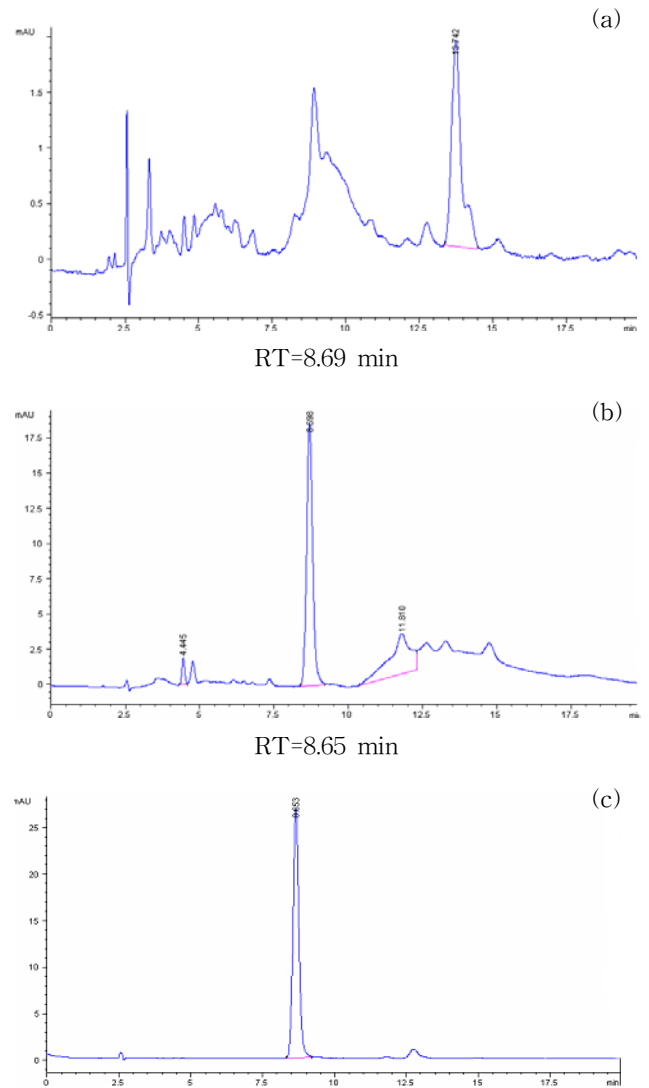


Fig. 2. HPLC chromatogram of *H. pluvialis* extract (ester form) before enzymatic hydrolysis (a), *H. pluvialis* hydrolysate (free form) (b) and synthetic astaxanthin (c).

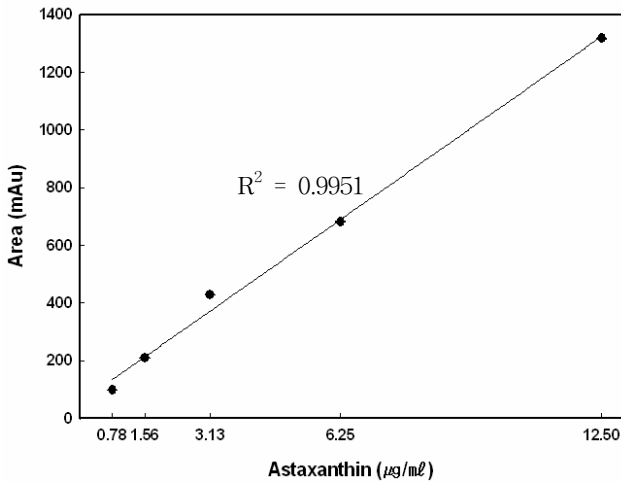


Fig. 3. Calibration curve for HPLC analysis of astaxanthin.

시간대(RT=8.6 min)에서 피크가 검출되는 것을 확인하였다(Fig. 2(c)). 반면, cholesterol esterase를 처리하지 않고 헤마토코커스 추출물을 분석한 경우 피크가 분리되지 않았다(Fig. 2(b)). 기존의 보고된 문헌에 의하면 유리 아스타잔틴을 대부분 함유하는 갑각류나 효모의 경우 추출 후 가수분해를 하지 않고 역상칼럼에서도 분석이 되는 것을 볼 수 있었고(8,9,19), 본 연구에서도 헤마토코커스와 비교를 위해 효모(*Phaffia rhodozyma*)에서 추출한 아스타잔틴을 동일한 조건으로 분석하였을 때 cholesterol esterase를 처리한 후 오히려 함량이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(데이터 제시 생략). 이것은 유리형의 아스타잔틴의 경우 오히려 cholesterol esterase 효소에 의해 변성이 일어나는 것을 보여주는 결과이다. 에스터 형태의 아스타잔틴을 분석 시에는 가수분해처리를 통해 에스터 결합을 제거시킨 후 분석을 수행해야하는 것을 확인할 수 있었다.

HPLC 분석조건은 C18 역상칼럼(Apollo C18)을 사용하고 유속은 1 mL/min, 이동상은 메탄올과 물의 혼합비는 95:5로 하였을 때, 추출물의 피크가 명확히 분리되었고 표준물질인 합성 아스타잔틴과 헤마토코커스 가수분해물의 분석이 원활히 이루어지는 것을 확인할 수 있었다. 아스타잔틴의 함량은 표준물질의 분석 유효범위인 12.5 ppm부터 0.78 ppm까지 작성된 검량선으로부터 산출하였다(Fig. 3). 기존의 보고된 아스타잔틴의 HPLC 분석에서도 일반적으로 C18 역상칼럼을 사용하였고, 이동상은 메탄올, 아세트나이트릴, 다이클로로메탄과 물 중 2가지 이상 혼합된 용액이 주로 사용되었다(20-25).

#### 분광학적 분석

합성 아스타잔틴, 헤마토코커스 추출물 및 효소처리 헤마토코커스 추출물의 구조적 차이를 검토하기 위해 UV/visible 스펙트럼과 FT-IR 스펙트럼을 분석하였다.

UV/visible spectrophotometer를 사용하여 300~600 nm

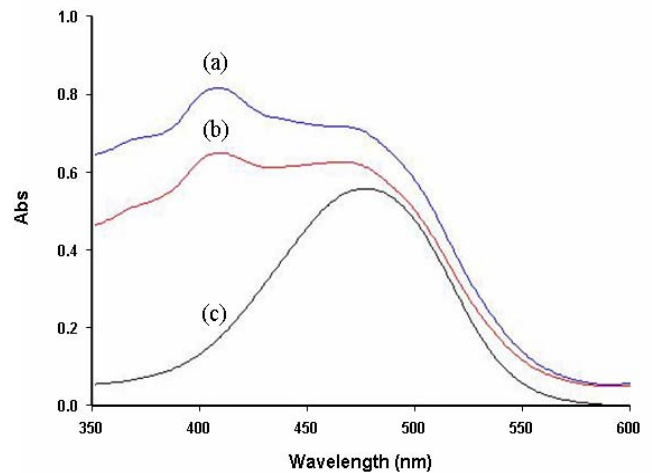


Fig. 4. UV/visible spectra of *H. pluvialis* extract (a), *H. pluvialis* hydrolysate (b) and synthetic astaxanthin (c).

파장범위에서 최대 흡수파장을 검토한 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 합성 아스타잔틴은 476 nm(Fig. 4(c)), 헤마토코커스 추출물은 408 nm에서 최대 흡수값을 나타냈고(Fig. 4(a)), cholesterol esterase를 이용하여 에스터기를 제거시켜 유리형으로 전환시킨 헤마토코커스 가수분해물은 409, 466 nm에서 최대 흡수값을 나타내었다(Fig. 4(b)). 합성 아스타잔틴(Fig. 4(c))과 헤마토코커스 추출물(Fig. 4(a))은 다른 흡수파장을 나타냈는데, 이것은 순도에 의한 차이에 기인하기 보다는 합성 아스타잔틴이 유리형인 반면 헤마토코커스 추출물이 에스터형의 아스타잔틴을 함유하는 등 구조적 차이가 있음을 보여주는 결과이다. 또한 cholesterol esterase의 처리에 의해 아스타잔틴을 유리형으로 전환시킨 헤마토코커스 가수분해물의 스펙트럼(Fig 4(b))은 가수분해 전의 스펙트럼과 비교하여 409 nm 파장에서의 흡수율이 줄어드는 것을 확인하였고, 466 nm의 파장에서 새로운 피크가 확인되었다. 이러한 결과는 추출물이 효소에 의해 유리형으로 구조적으로 전환된 것을 완전히 뒷받침할 수는 없으나, 가수분해 처리에 의해 어느 정도 추출물내의 조성물에 변화가 일어났음을 간접적으로 시사하는 결과이다.

FT-IR 스펙트럼 분석을 통해 합성 아스타잔틴과 에스터형 헤마토코커스 추출물과 가수분해 효소처리 헤마토코커스 가수분해물(유리형)의 구조적 차이를 검토하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 유리형 합성 아스타잔틴과 헤마토코커스 추출물(에스터형 아스타잔틴 함유)과 헤마토코커스 가수분해물(유리형 아스타잔틴 함유)은 구조적 차이를 나타냈다. 유리형 합성 아스타잔틴의 경우 1750  $\text{cm}^{-1}$ 에서 C=O 결합 피크, 3500  $\text{cm}^{-1}$ 에서 O-H 결합 피크와 1000  $\text{cm}^{-1}$ 에서 C-O 결합 피크가 강하게 나타난 것으로 확인할 수 있었다(Fig. 5(c)). 이것은 Chen(26) 등과 Yuan(27) 등이 보고한 합성 아스타잔틴의 FT-IR 스펙트럼과 비슷한 경향을 나타냄을 확인할 수 있었다. 헤마토코커스 추출물의 스펙트럼에

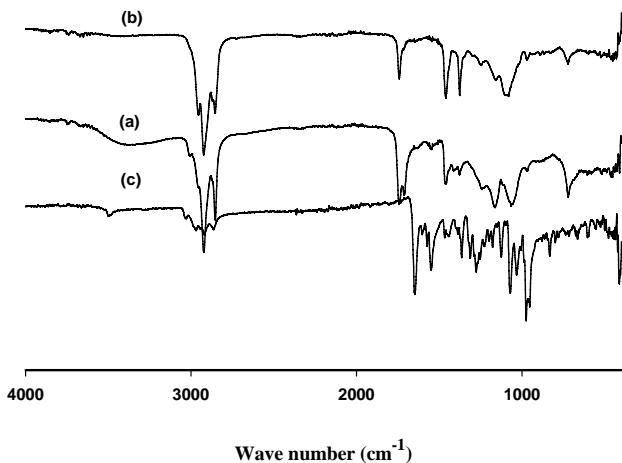


Fig. 5. FT-IR spectra of *H. pluvialis* extract (a), *H. pluvialis* hydrolysate (b) and synthetic astaxanthin (c).

서는 유리형 합성 아스타잔틴의 스펙트럼과 다르게 3300  $\text{cm}^{-1}$ 에서 피크가 나타났으나(Fig. 5(b)), 가수분해 처리 후에는 피크가 나타나지 않음을 확인하였다(Fig. 5(a)). 또한, 유리형 합성 아스타잔틴의 경우에는 1750  $\text{cm}^{-1}$ 에서 C=O 결합 피크가 단일하게 나타났으나, 헤마토코커스 추출물의 스펙트럼에서는 C=O 피크 옆에 에스터 결합상의 alkyl chain에서 유래한 것으로 판단되는 피크 하나가 붙어서 나타났으며, 가수분해 후에는 피크가 없어진 것을 확인하였다. 헤마토코커스 가수분해물, 헤마토코커스 추출물 및 합성 아스타잔틴 간에 스펙트럼이 일치하진 않았으나, 유리형의 아스타잔틴을 함유할 것으로 추정되는 헤마토코커스 가수분해물과 합성 아스타잔틴과 같은 경우에는 피크의 양상이 비슷하게 나타났고, 헤마토코커스 추출물과 헤마토코커스 가수분해물은 구조적 차이를 나타냄을 확인하였다.

## 요 약

본 연구에서는 헤마토코커스 플루비알리스(*H. pluvialis*)의 파쇄세포(cracked cell)로부터 추출된 아스타잔틴의 HPLC 분석방법을 확립하고, UV/visible 및 FT-IR 분광분석법을 이용하여 헤마토코커스 추출물과 합성 아스타잔틴의 구조적 특성을 조사하였다. 아스타잔틴을 메탄올 용매에 녹이고, 45분 정도 초음파로 처리할 경우 교반처리하는 경우보다 1.5배 정도 용해율이 높아지는 것을 확인하였다. 에스터 형태로 존재하는 추출물 중의 아스타잔틴의 분석을 위해 cholesterol esterase를 이용해 헤마토코커스 추출물을 가수분해처리를 하여 유리형으로 전환시킨 후 HPLC 분석을 수행하였다. 아스타잔틴의 함량을 분석하기 위해 역상칼럼(C18)과 UV/visible 검출기를 사용하였고, 이동상은 메탄올과 물(95:5)의 혼합용매를 사용하여 분석하였다. 효소처리 후, 헤마토코커스 추출물의 흡수스펙트럼이 합성 아스타잔

틴과 유사한 패턴으로 변화하는 것을 확인함으로써 헤마토코커스로부터의 아스타잔틴의 추출 및 분석조건을 확립하였다.

## 문 헌

1. Shimidzu N, Goto M, Miki W. 1996. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fish Sci* 62: 134-137.
2. Bendich A. 1991. Non vitamin a activity of carotenoids: immuno enhancement. *Food Sci Technol Res* 2: 127-130.
3. Chew BP, Park JS, Wong MW, Wong TS. 1999. A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice *in vivo*. *Anticancer Res* 19: 1849-1854.
4. Jyonouchi H, Sun S, Iijima K, Gross M. 2000. Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. *Nutr Cancer* 36: 59-65.
5. Snodderly DM. 1995. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am J Clin Nutr* 62: 1448-1461.
6. Lee CK. 2003. Process development for astaxanthin production by microalgae. Ministry of Maritime Affairs & Fisheries, Korea.
7. Johnson EA, Schroeder WA. 1995. Microbial carotenoids production. *Adv Biochem Eng* 53: 119-178.
8. Schroeder WA, Johnson EA. 1993. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J Gen Microbiol* 39: 907-912.
9. Sedmak JJ, Weerasinghe DK, Jolly SO. 1990. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol Technol* 4: 107-112.
10. Lorenz RT, Cysewski GR. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Tibtech* 18: 160-167.
11. Park EK, Seo MW, Lee CK. 2001. Effects of medium compositions for the growth and the astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 29: 227-233.
12. Grung M, Jensen SL. 1991. Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S,3S)-astaxanthin esters. *J Appl Phycol* 4: 165-171.
13. Kobayashi M. 2003. Astaxanthin biosynthesis enhanced by reactive oxygen species in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 8: 322-330.
14. Kang CD, Park TH, Sim SJ. 2006. Biological CO<sub>2</sub> fixation to antioxidant carotenoids by photosynthesis using the green microalga *Haematococcus pluvialis*. *Kor Chem Eng Res* 44: 46-51.
15. Orosa M, Franqueira D, Cid A, Abalde J. 2005. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol* 96: 373-378.
16. Kim ZH, Kim SH, Lee HS, Lee CG. 2006. Enhanced production of astaxanthin by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme Microb Technol* 39: 414-419.
17. Lim KB, Lee EK, Lee SY. 2003. Extraction method of astaxanthin using supercritical fluid extraction. *Korean Patent* 0465556.
18. Han JY, Lee SJ, Jung MK, Choi SK. 2000. Process for extracting astaxanthin pigment from blue-green algae and extracted pigment thereof. *Korean Patent* 0411364.

19. Yun MJ, Kim JH, Choi HY, Kim SK, Gu YS. 2004. The manufacturing method of high-enriched astaxanthin. *Korean Patent* 0543088.
20. Xu BJ, Fang ZM, Kang HJ, Wang QJ, Mo EK, Sung CK. 2003. Liquid chromatographic determination of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*. *Kor J Food Nutr* 16: 165-170.
21. Kraay GW, Zapata M, Veldhuis MJ. 1992. Separation of chlorophylls c-1, c-2, and c-3 of marine phytoplankton by reversed phase C18 high performance liquid chromatography. *J Phycol* 28: 708-712.
22. Lee S, Lee YK, Soh CW. 1991. Accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). *J Phycol* 27: 575-577.
23. Margalith PZ. 1999. Production of ketocarotenoids by microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 431-438.
24. Olaizola M. 2000. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25000-liter outdoor photobioreactors. *J Appl Phycol* 12: 499-506.
25. Renstrøm B, Borch G, Skulberg OM, Jensen SL. 1981. Optical purity of (3S,3'S)-astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Phytochemistry* 20: 2561-2564.
26. Chen X, Chen R, Guo Z, Li C, Li P. 2007. The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with  $\beta$ -cyclodextrin. *Food Chem* 101: 1-5.
27. Yuan C, Jin Z, Xu X, Zhuang H, Shen W. 2008. Preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Food Chem* 109: 264-268.

(2008년 3월 19일 접수; 2008년 9월 16일 채택)