

## Extraction and Stabilization of Anthocyanin Pigments from *Morus alba* Fruits

Kyeong-Hwa Seo · Dae-Young Lee · Rak-Hun Jeong · Young-Eon Kim ·  
Young-Rae Kim · Eock-Kee Hong · Myun-Ho Bang · Nam-In Baek\*

### 오디 anthocyanin 색소의 추출 및 저장 안정성

서경화 · 이대영 · 정락훈 · 김영언 · 김영래 · 홍역기 · 방면호 · 백남인\*

Received: 7 June 2013 / Accepted: 30 August 2013 / Published Online: 31 March 2014

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2014

**Abstract** This study was initiated to search for the most effective method for extraction of anthocyanins from *Morus alba* Fruits using organic acids and to evaluate the stability of the pigments at various storage environments. The anthocyanins were effectively extracted by addition of organic acids such as citric acid, malic acid and fumaric acid. The anthocyanins were not degraded at 25°C and under a fluorescent light with 183 lux, but sharply degraded at 60°C.

**Keywords** anthocyanin · extraction · *Morus alba* · mulberry · organic acid · stability

뽕나무(*Morus alba*)는 뽕나무과(Moraceae)에 속하는 낙엽교목으로 우리나라 전역에 분포하고 있다. 6–10 m까지 자라며, 수피는 회갈색이다. 열매는 장과로 6월에 흑색으로 익는다(Lee,

2003; Yoon, 2004). 뽕나무 열매인 오디는 상심자(桑子), 상실(桑實) 흑심(黑) 등으로 불리며 백발을 검게 하며, 소갈을 덜어주고 오장을 이롭게 하는 자양 강장제로 널리 사용되고 있다(Kim, 1991; Park 등 1997). 지금까지 오디로부터 분리된 성분으로는 flavonoid와 stilbene 등이 있으며, 색소인 anthocyanin도 많이 함유되어 있다(Du 등, 2008; Kim 등, 2008; Dat 등, 2010).

Anthocyanin 색소는 식물의 열매, 꽃, 잎, 줄기 등에 함유되어 있어 붉은색, 푸른색, 보라색 등의 색을 띤다. 시력개선(Politzer, 1977), 항산화(Yoshiki 등, 1995; Du 등, 2008) 등 다양한 생리 활성이 보고되어 있고, 인체에 무해한 천연색소 및 기능성 식품 소재로 각광받고 있다. Phenylchromane (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>)의 기본 골격으로 C환의 1번 위치의 산소가 3개로 되어 있어서 양이온으로 하전되어 있는 oxonium 형태가 anthocyanin의 불안정성을 야기시키기 때문에 제품화의 걸림돌이 되고 있다. 따라서 오디 색소의 안정화 방법이 확립되어야 한다. 국외에서는 라즈베리, 블루베리, 딸기, 포도의 anthocyanin의 안정성 및 분석법에 대한 연구가 보고되어 있다(Cristina, 1998; Skrede 등, 2006; Khanal 등, 2010). 국내에서는 오디, 유색감자, 유색미, 자색고구마 등 다양한 식물에 관하여 연구되어 있다(Kang 등, 2003; Park 등, 2004; Yoon 등, 1997; Park 등, 2011). 대부분의 연구결과는 주로 anthocyanin 색소의 안정성에 대한 것이지만 오디에 함유된 anthocyanin에 관한 연구는 미진하다. 또한 오디로부터 anthocyanin 추출 시 추출 수율을 높이기 위하여 무기산을 첨가한 보고가 있다(Kim, 2003; Kim 등, 2005). 무기산의 음이온이 안토시아닌의 oxonium 양이온과 안정한 염의 형태를 생성하기 때문에 추출 속도가 높아지게 된다. 또한 무기산을 이용하면, 산화효소의 작용을 억제하여 anthocyanin 색소를 안정화 시키는 역할을 한다. 하지만 기능성 식품에 이용하기 위해 무기산을 대체 할 수 있는 방법의 개발이 필요하다. 따라서 본 연구는 천연소재로부터 효과적으로 색소를 추출하고, 오디 가공 및 저장 시 발생할 수 있는 anthocyanin 색소의 안

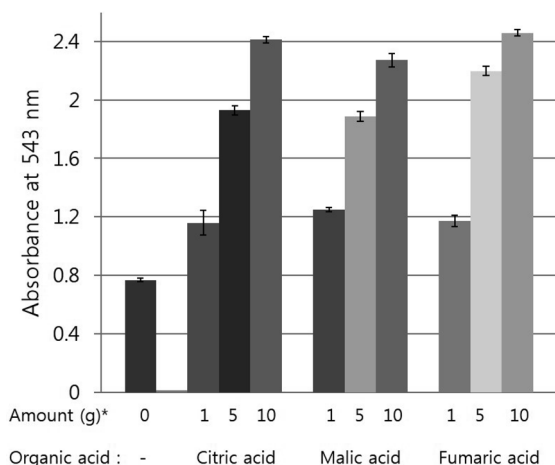
K.-H. Seo · R.-H. Jeong · M.-H. Bang · N.-I. Baek  
Graduate School of Biotechnology and Department of Oriental Medicinal  
Materials & Processing, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Republic  
of Korea

D.-Y. Lee  
Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural  
and Herbal Science, RDA, Eumseong 369-873, Republic of Korea

Y.-E. Kim  
Korea Food Research Institute, Sunnam 463-746, Republic of Korea

Y.-R. Kim · E.-K. Hong  
School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National  
University, Chunchon 200-701, Republic of Korea

\*Corresponding author (N.-I. Baek: nibaek@khu.ac.kr)



**Fig. 1** Extraction yield of anthocyanins from *Morus alba* treated with various concentration of organic acids. \*Amount of organic acid per 100 g of *Morus alba* fruits. The bar was presented as mean and standard deviation from triplicated experiments.

정성을 측정하기 위한 방법을 확립하여 오디의 식품 소재화에 대한 기초 자료를 제공하고자 실시하였다.

본 실험에서 사용한 오디(*M. alba*)는 2011년 8월에 한국식품연구원에서 제공받았고, 표본시료(KHU-NPCL-20110826)는 경희대학교 천연물화학실에 보관되어 있다.

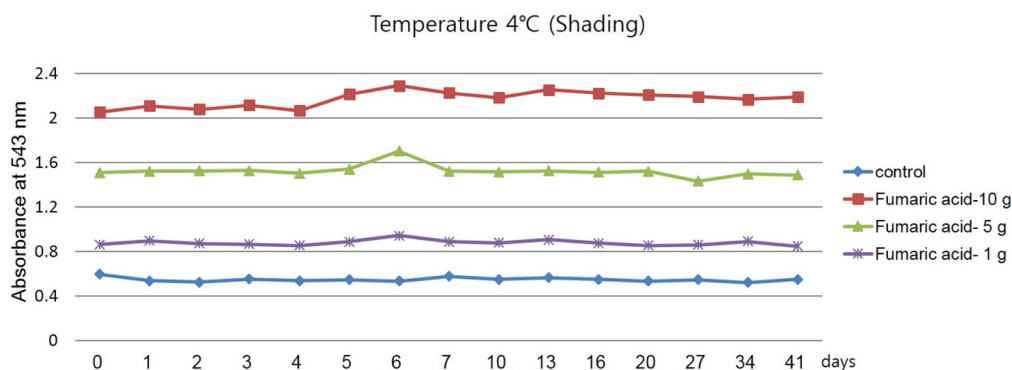
식용 가능한 유기산을 이용하여 anthocyanin 색소 고함유 추출물 제조 조건을 확립하기 위하여 분쇄된 오디 100 g에 citric acid, malic acid, fumaric acid를 각각 세가지 농도, 즉 1, 5, 10 g씩 첨가하고, 하나는 유기산을 첨가하지 않는 대조군으로 하여 1차 추출은 100% EtOH 100 mL로 추출한 다음 여액 및 잔사를 여과하여 70% EtOH 다시 2회 100 mL로 추출하였다. 여과지로 여과한 추출용액에 대하여 UV-Visible 분광광도계를 이용하여 543 nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 실험은 3회 반복 실시하였다(Fig. 1). 그 결과 대조군에 비하여 유기산 첨가 시 흡광도가 증가하였고, 유기산의 농도가 높아질수록 흡광도도 같이 높아졌다. 오디 100 g에 citric acid 1 g 첨가 추출 시 대조군에 비하여 51±0.08%, 5 g 첨가 시 150±0.03%, 10 g 첨가 시 213±0.02% 추출 수율이 증가하였고, malic acid의 경우 1 g 첨가 추출 시 대조군에 비하여 62±0.02%, 5 g 첨가 시 145±0.04%,

10 g 첨가 시 195±0.05% 증가하였으며, fumaric acid의 경우 1 g 첨가 추출 시 대조군에 비하여 52±0.04%, 5 g 첨가 시 186±0.03%, 10 g 첨가 시 219±0.02% 추출 수율이 증가하는 것을 확인하였다. 오디에 첨가한 유기산 종류에 따른 anthocyanin 추출물에 대한 흡광도의 차이는 그다지 크게 나타나진 않았지만, 몰 농도로 환산하였을 때에는 citric acid > fumaric acid > malic acid 순으로 나타났다. 이는 유기산 첨가에 따른 농색화 현상에 기인하는데, 각 유기산의 산 해리상수 즉 pKa 값이 citric acid는 2.93±0.28, fumaric acid는 3.15±0.10, malic acid는 3.61±0.23 인 점으로부터 확인되었다. 하지만 기존에 citric acid 첨가에 의한 anthocyanin 추출에 대한 연구가 많이 보고되어 있는 실정이라서(Kang 등, 2003; Park 등, 2004), fumaric acid를 사용하여 anthocyanin 추출물의 안정성에 대한 실험을 실시하였다.

오디 anthocyanin 색소의 안정성에 대한 온도의 영향을 조사 하였다. Anthocyanin 추출 효과가 우수한 것으로 나타난 fumaric acid를 1, 5, 10 g씩 오디 100 g에 각각 첨가하여 추출 하였다. 1차 추출은 100% EtOH 100 mL로 추출한 다음 여액 및 잔사를 여과하여 70% EtOH 다시 2회 추출한 여과액을 합한 후 여액 20 mL를 25 mL vial에 넣고 밀봉 하였다. 빛을 차단하기 위하여 aluminum foil로 감싼 후 4, 25, 60°C에서 각각 보관하였다. 저장 1일에서 7일까지는 24시간 간격으로 시료를 1 mL씩 취하여 분광광도계를 이용하여 543 nm에서 추출액의 흡광도 변화를 측정하였으며, 이후는 3일 혹은 7일 간격으로 시료를 취하여 41일까지 실험하였다. 오디 anthocyanin 색소의 안정성에 대한 온도의 영향은 Fig. 2, 3와 4에 나타난 바와 같다.

냉장(4°C) 조건에서 저장하였을 경우 fumaric acid 1 및 5 g 첨가 시 0일차부터 41일차까지 흡광도의 차이가 거의 나타나지 않았다. 10 g을 첨가하였을 경우 5일과 6일째부터 다소 증가하였으나 차이가 크게 나타나지 않았다. 따라서 4°C에서는 anthocyanin의 분해는 거의 일어나지 않았다.

상온(25°C) 조건에서 저장 하였을 경우 유기산 무첨가에서는 흡광도의 차이가 거의 나타나지 않았다. Fumaric acid 1 g 첨가에서는 흡광도가 매우 서서히 감소하여 41일째에는 6일에 비해 12% 감소하였다. 5 g 첨가에서는 7일차부터 약간씩 감소하기 시작하여 0일차에 비하여 3% 감소하였고, 41일차에서는 17% 감소하였다. 10 g 첨가에서도 7일차부터 감소하였으며, 41일차에는 0일차에 비해 16% 감소하였다. 따라서 상온에서 저장 시에는 6일까지는 거의 변화가 없었으나 그 이후 조금씩 anthocyanin이 분해하는 것으로 나타났다.



**Fig. 2** Effect of storage temperature (4°C) and shading on stability of anthocyanin solution from *Morus alba* fruits.

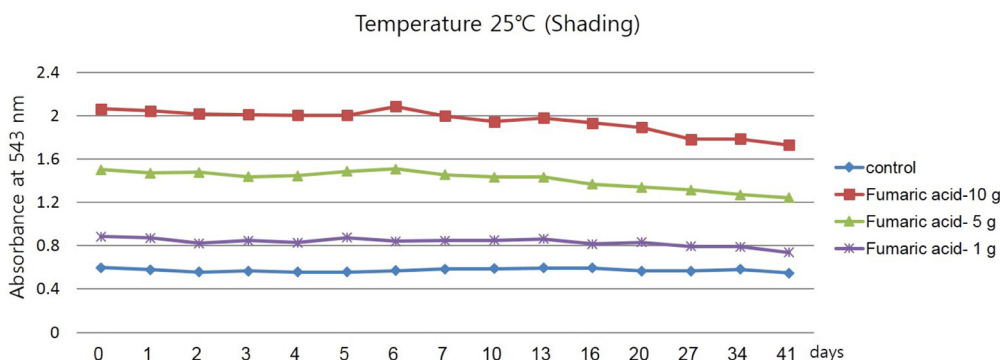


Fig. 3 Effect of storage temperature (25°C) and shading on stability of anthocyanin solution from *Morus alba* fruits.

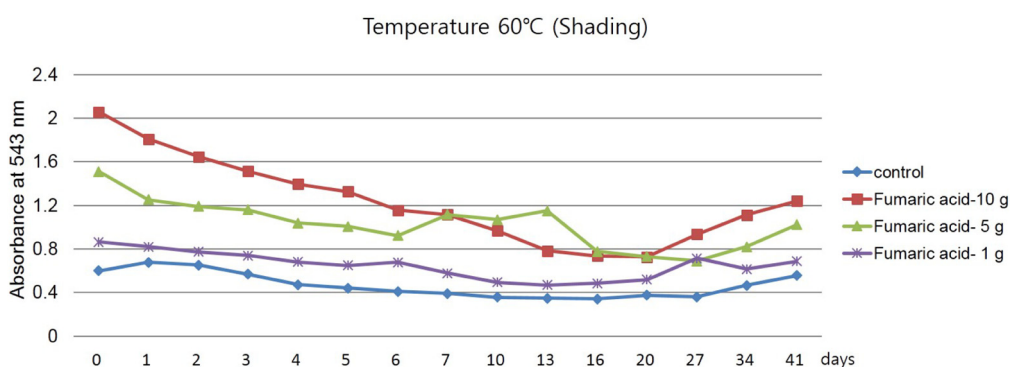


Fig. 4 Effect of storage temperature (60°C) and shading on stability of anthocyanin solution from *Morus alba* fruits.

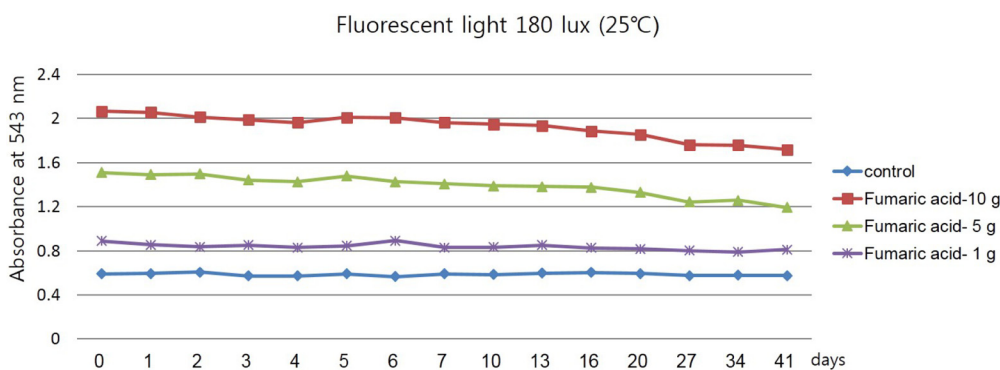


Fig. 5 Effect of fluorescent light (180 lux) on stability of anthocyanin solution from *Morus alba* fruits.

고온(60°C) 조건에서 저장 하였을 경우 유기산 무첨가 시 3 일차부터 감소하였으며 16일차에 최대 감소하여 0일차에 비하여 43% 감소하였다. 그 이후에는 다시 서서히 증가하였다. Fumaric acid 1 g 첨가에서는 1일차부터 감소하여 16일차에 최대 감소하여 초기에 비하여 44% 감소하였으나 그 이후에는 다시 증가하여 41일차에는 16일차에 비해 42% 증가하여 초기와 비교 시에는 20% 감소하였다. Fumaric acid 5 g 첨가에서는 1 일차부터 감소하여 27일차 최대 감소하여 초기에 비하여 54% 감소하였으나 41일차에는 27일차에 비하여 48% 증가하여 초기와 비교시 32% 감소하였다. Fumaric acid 10 g 첨가에서도 20 일차에 최대 감소하여 초기에 비하여 65%나 감소하였고 그 이후 다시 증가하여 41일차에는 27일차에 비해 33% 증가하였고 초기와 비교 시 40% 감소하였다.

저장 온도에 따른 anthocyanin 용액의 흡광도 변화를 종합해 보면, 4°C에서는 거의 변화가 없었으나, 25°C에서는 저장 6-7 일째부터 조금씩 감소하는 것으로 나타났다. 60°C에서는 저장 후 즉시 급격하게 감소하였으나 저장 16-20일부터는 다시 증가하였다. 이는 열에 의해 분해된 분해산물들이 다시 열에 의하여 축합하여 543 nm의 빛을 흡수하는 어떤 화합물을 생성하는 것으로 예측되며, 그 메커니즘에 관해서는 추후 LC/MS를 이용하여 규명하고자 한다. 박 등(Park 등, 2011)은 자색고구마 anthocyanin은 40°C 이하의 온도에서는 비교적 안정하나, 60°C 이상에서는 빠르게 분해된다는 것과 유사한 결과를 나타내었다. 이를 통하여 식품 제조 공정 시 열처리 온도를 낮게 하거나, 혹은 높게 진행 할 시에는 열처리 시간을 짧게 해야 할 것으로 사료된다.

오디 anthocyanin 색소의 안정성에 대한 빛의 영향을 조사하기 위하여 오디 100 g에 fumaric acid를 1, 5와 10 g을 각각 첨가한 후 EtOH 100 mL로 추출하였다. 추출물 20 mL을 25 mL vial에 넣고 밀봉한 후 일부는 상온(25°C) 183 lux 형광 하에서 보관하였고, 나머지는 빛을 차단하기 위하여 aluminum foil에 감싼 후 암소에서 보관하였다. 24시간 간격으로 시료를 취하여 분광광도계를 이용하여 543 nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다 오디 anthocyanin 색소의 안정성에 대한 빛의 영향은 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 상온 183 lux의 형광 하에서 저장 기간에 따른 흡광도의 차이는 거의 없었다. 유기산 무첨가에서는 흡광도의 차이가 거의 없었다. 유기산 1 g 처리시에는 아주 조금씩 감소하여 41일차에는 10일차에 비하여 불과 3% 감소하였다. Fumaric acid 5g과 10 g 첨가에서는 약간씩 감소하여 41일차에서 21와 17%로 각각 감소하는 것으로 나타났다. 하지만 동일온도인 25°C 실온 저장 차광 조건에서의 anthocyanin 감소의 정도와 거의 동일하였다. 따라서 식품 제조나 저장 시는 183 lux 이하의 형광조건에서 작업하는데, 이 경우 빛에 의해 anthocyanin이 파괴되는 정도는 무시할 수 있는 정도로 판단되었다. 김 등은(Kim 등, 2003) 크랜베리 수용액 색상의 안정성 측정 시, 일광 2일 만에 11%로 색깔의 강도가 떨어졌다고 보고하였으며, 박 등은(Park 등, 2004) 저장 초기부터 지속적으로 15일째까지 안정성이 떨어지는 것으로 확인하였다. 이를 종합하여 anthocyanin의 경우 고온에 대한 오디 anthocyanin 색소는 비교적 급격하게 파괴되었으나, 형광 183 lux 이하, 실온 이하의 저온에서 저장 시에는 색소의 분해가 거의 일어나지 않는 것으로 판단되었다.

**감사의 글** 본 연구는 농림기술관리센터(iPET)에서 지원하는 '고부가 식품 기술개발사업'(과제번호:311025-03-2-SB010)에 의해 이루어진 것으로 연구비 지원에 감사 드립니다.

## References

- Cristina GV, Pilar Z, Francisco A, Fernando R, Pedro A, and Francisco TB (1998) Colour and Anthocyanin Stability of Red Raspberry Jam. *J Sci Food Agric* **78**, 565-73.
- Dat NT, Binh PTX, Quynh LTP, Minh CV, Huong HT, and Lee JJ (2010) Cytotoxic Prenylated Flavonoids from *Morus alba*. *Fitoterapia* **81**, 1224-7.
- Du Q, Zheng J, and Xu Y (2008) Composition of Anthocyanins in Mulberry and Their Antioxidant Activity. *J Food Composition and Analysis* **21**, 390-5.
- Kang CS, Ma SJ, Cho WD, and Kim JM (2003) Stability of Anthocyanin Pigment Extracted from Mulberry Fruit. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **32**, 960-4.
- Khanal RC, Howard LR, and Prior RL (2010) Effect of Heating on the Stability of Grape and Blueberry Pomace Procyanidins and Total Anthocyanins. *Food Res Int* **43**, 1464-9.
- Kim HB (2003) Quantification of Cyanidin-3-glucoside in Mulberry Fruits and Grapes. *Korean J Seric Sci* **45**, 1-5.
- Kim HB, Kim SL, and Kang SW (2008) The method for manufacturing the cyanidin-3-glucoside derived from a mulberry with the food coloring powder. KR 10-2008-0054984
- Kim HB, Kim SY, Lee HY, Kim SL, and Kang SW (2005) Protective Effect against Neuronal Cell and Inhibitory Activity against Bacteria of Mulberry Fruit Extracts. *Korean J Crop Sci* **50**, 220-3.
- Kim JH, LEE JH, and Baik CK (2003) Characteristics and Stability of the Color of the Cranberry Solution. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **32**, 806-11.
- Kim JS, Ha TY, Ahn JY, Kim HK, and Kim SN (2008) Composition and Quantitative Analysis of Stilbenoids in Mulberry Leaves and Fruits with DAD/HPLC. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **37**, 124-8.
- Kim SK (1991) Beneficial Medicine, Mulberry Fruit. In *Bonchohak*, pp. 598-605, Yoinglimsa, Korea
- Lee TchB (2003) In *Coloured Flora of Korea*, p. 222, Hyang Mun Sa, Korea.
- Park HJ, Jeon TW, Lee SH, Cho YS, Cho SM, and Chang KS (2004) Studies on Characteristics and Stability of Anthocyanin Pigment Extracted from Korean Purple-Fleshed Potatoes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **33**, 1544-51.
- Park JS, Bae JO, Chung BW, Jung MY, and Choi DS (2011) Degradation Kinetics of Anthocyanin Pigment Solutions from Purple-fleshed Sweet Potato Cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **24**, 559-66.
- Park SW, Chung IS, and Ko GC (1997) Quantitative Analysis of Anthocyanins among Mulberry Cultivars and Their Pharmacological Screening. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **38**, 722-4.
- Politzer M (1977) Experience in the Medical Treatment of Progressive Myopia. *Klin Monatsbl Augenheilkd* **4**, 616-9.
- Rommel A, Heatherbell DA, and Wrolstad RE (1990) Red Raspberry Juice and Wine: Effect of Processing and Storage on Anthocyanin Pigment Composition, Color and Appearance. *J Food Sci* **55**, 1011-7.
- Skrede G, Wrolstad RE, Lea P, and Enersen G (2006) Color Stability of Strawberry and Blackcurrant Syrups. *J Food Sci* **57**, 172-7.
- Yoon JB (2004) In *Find Wood Easily*, Jin Sun, Korea.
- Yoon JM, Cho MH, Hahn TR, Paik YS, and Yoon HH (1997) Physicochemical Stability of Anthocyanins from a Korean Pigmented Rice Variety as Natural Food Colorants. *Korean J Food Sci Technol* **29**, 211-7.
- Yoshiki Y, Okubo K, and Igarashi K (1995) Chemiluminescence of Anthocyanins in the Presence of Acetaldehyde and tert-Butyl Hydroperoxide. *J Biolumin Chemilumin* **10**, 335-8.