

미세조류로부터의 에너지 효율적인 Astaxanthin 회수 기술 개발

김선영 · 오유관*[†] · 하성호[†]

한남대학교 화공신소재공학과
34054 대전광역시 유성구 유성대로 1646

*부산대학교 화공생명공학과

46241 부산광역시 금정구 부산대학로 63번길 2

(2018년 4월 10일 접수, 2018년 5월 4일 수정본 접수, 2018년 5월 8일 채택)

Recovery of Astaxanthin from microalgae Using Simple and Energy-efficient Method

Sun Young Kim, You-Kwan Oh*[†] and Sung Ho Ha[†]

Department of Advanced Materials & Chemical Engineering, Hannam University, 1646, Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon, 34054, Korea
*Department of Chemical & Biomolecular Engineering, Pusan National University, 2, Busandaehak-ro 63beon-gil,
Geumjeong-gu, Busan, 46241, Korea

(Received 10 April 2018; Received in revised form 4 May 2018; accepted 8 May 2018)

요 약

강력한 항산화물질인 astaxanthin의 함량이 다른 천연 공급원에 비해 높아 astaxanthin 생산균주로 주목받고 있는 *Haematococcus pluvialis*는 상당한 두께의 견고한 세포벽을 가지고 있어, 세포 파쇄를 위해 많은 에너지가 소모되고 비용이 비싼 방법들이 이용되고 있다. 이에 *H. pluvialis*로부터 막자와 막자사발을 이용하여 astaxanthin을 손쉽게 효율적으로 추출하는 방법을 제시하였다. 막자와 막자사발을 이용하여 분쇄한 후 추출용매로 acetonitrile, acetone, methanol, dichloromethane : methanol (1:3, v/v), ethylacetate : ethanol (1:1, v/v)로 사용하여 비교하였을 때, acetone을 이용하였을 때 astaxanthin을 1.13~1.29 배 더 높은 효율로 추출할 수 있었다. 또한 acetone으로 *H. pluvialis*로부터 추출할 경우, 1차 추출로 *H. pluvialis*에 축적되어 있는 전체 astaxanthin의 96.7%를 회수할 수 있을 정도로 acetone은 astaxanthin 추출효율이 높았다. *H. pluvialis*가 세포내에 축적하는 astaxanthin은 축적 특성상 ester-형태의 astaxanthin로 다량 축적하므로, 추출물 내의 다양한 형태의 astaxanthin을 분리하기 위하여 농도 구배 시스템을 적용한 HPLC 분석을 수행하였다. *H. pluvialis*에 축적되어 있는 전체 astaxanthin 중 free astaxanthin이 45.9%이고, 나머지 54.1%는 ester-형태의 astaxanthin이었다.

Abstract – The astaxanthin recovery efficiencies were compared in acetonitrile, acetone, methanol, dichloromethane : methanol (1:3, v/v) and ethylacetate : ethanol (1:1, v/v) as an extraction solvent after the grinding of the *H. pluvialis* cells. The astaxanthin extraction yield in acetone was 1.13~1.29 times higher than other extraction solvents. It was also found that 96.7% of astaxanthin accumulated in *H. pluvialis* could be recovered by a single extraction. Since astaxanthin exists mainly as astaxanthin esters in *H. pluvialis*, a gradient reversed-phase HPLC analysis was carried out for the separation of astaxanthin esters from the extracts of *H. pluvialis*. Among the astaxanthin inside the *H. pluvialis* cell, free astaxanthin was 45.9% and astaxanthin esters were the rest.

Key words: Astaxanthin, *Haematococcus pluvialis*, Solvent extraction, Efficiency

1. 서 론

현대 사회는 고령화 인구의 증가로 건강에 대한 관심이 증가하면서 삶의 질 향상 뿐만 아니라 노화 억제와 질병치료에 많은 관심을 가

지고 있다. 이로 인해 기능성 식품과 천연물, 항산화 물질에 대한 관심이 증가하고 있다. 그 중 ketocarotenoid계 적색소인 astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β , β' -carotene-4,4'-dione)은 다른 카로티노이드 보다 최소한 10배 이상, 지용성 vitamin E인 α -토코페롤(α -tocopherol) 보다는 550배 이상의 항산화 활성을 가지는 강력한 항산화 물질로 알려져 있다[1-4]. 이는 astaxanthin의 기본 구조에서 C-4와 C-4'에 위치한 oxo 그룹 때문인 것으로 보고되어 있다[1]. 특히, astaxanthin은 자외선 조사로부터 피부를 방어할 수 있고, 노화와 관련되는 망막

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: youkwan@pusan.ac.kr, shha@hannam.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

항반의 퇴화를 개선할 수 있고, 화학물질에 의해 발생하는 암으로부터 방어할 수 있으며, 고밀도 지방단백을 증가시키고, 면역시스템 강화 등의 여러 다양한 기능성이 입증되면서 기능성 식품, 화장품 등에 사용되면서 생물학적 응용에 대한 연구가 증가되고 있고, 특히 의약품이나 화장품, 식품 산업 등에서 그 소재로서의 활용이 기대되고 있는 물질이다[2,5,6].

현재 사용되는 대부분의 astaxanthin은 화학적으로 합성되는데, 자연계에서 생산되는 천연 astaxanthin에 비해 항산화력이 낮고 생체 흡수율 또한 낮다는 단점을 가지고 있다[7,8]. 또한 높은 합성비용과 식품 안전에 대한 우려로 인한 자연식품에 대한 수요 증가로 천연 astaxanthin에 대한 연구가 최근들어 활발하게 진행되고 있다[8]. 게, 새우 등의 갑각류나 효모, 해양생물 등이 astaxanthin의 천연 공급원이다. 갑각류에서 추출된 astaxanthin은 추출이 쉬운 장점은 있으나 높은 회분 및 키틴 함량으로 사용이 제한되고 있다. 효모 *Phaffia rhodozyma*는 소량의 astaxanthin을 함유하고 생체 이용률이 낮은 형태만을 생산하여 현재 동물사료로만 활용되고 있는 실정이다[9].

광합성 미생물 중의 하나인 녹색 단세포 미세조류(unicellular green microalgae)인 *Haematococcus pluvialis*는 최근들어 주목받는 astaxanthin의 생산 균주로, astaxanthin의 함량이 1.5~3% 수준으로 상업적으로 이용되고 있는 *Euphausia pacifica* (크릴 새우, ~120 ppm)나 *Pandalus borealis* (북극 새우, ~1,200 ppm)와 같은 다른 공급원에 비해 높은 함량(~40,000 ppm)을 보일 뿐만 아니라 생체 내에서 안정한 형태의 astaxanthin을 95% 이상 생산한다[4,8,10]. 외부 환경 조건에 따라 *H. pluvialis*는 크게 두 가지 형태, 녹색의 영양세포 형태(green vegetative cells)와 붉은색의 휴면 포낭 세포 형태(red cyst cells)로 나누어진다[11,12]. 우호적 환경에서는 두 개의 편모를 가지고 유행하는 녹색의 영양세포가 안정적으로 성장하다가, 질소 원 고갈, 고 광도 조사, 높은 온도 등과 같은 비우호적인 환경에 노출되면 녹색의 세포들이 이동성이 없는 붉은색의 휴면 포낭 세포로 전환하며, 이때 2차 대사산물로 astaxanthin을 다량 축적한다[13-15].

한편 상당한 두께의 견고한 세포벽을 가진 *H. pluvialis*로부터 astaxanthin을 추출하기 위하여 homogenation, sonication, microwave, supercritical fluid 등을 이용한 공정들이 보고되고 있으나 고온 고압의 환경과 많은 에너지를 필요로 하는 장치의 사용이라는 단점들이 있다[16]. 그러므로, 고가의 장치 없이 *H. pluvialis*로부터 astaxanthin을 손쉽게 추출할 수 있는 방법의 시도가 필요하다.

이에 본 연구에서는 의약품, 화장품, 식품 등에서 여러 가지 다양한 기능성이 입증되고 있는 astaxanthin이 높은 함량으로 축적되어 있는 *Haematococcus pluvialis*로부터 유기용매를 이용하여 astaxanthin을 손쉽게 효율적으로 추출하기 위한 방법을 시도하였고, 추출 횟수에 따른 추출효율의 영향 또한 알아보았다. Astaxanthin의 함량을 분석하는 방법으로 분광광도법과 HPLC 분석방법을 확립하여, *H. pluvialis*로부터 추출한 astaxanthin의 잔존 함량을 비교 분석하였다.

2. 실험

2-1. 실험재료

본 연구에 사용된 *Haematococcus pluvialis*는 *Haematococcus pluvialis* powder A030 (China)이다. Astaxanthin은 이중결합을 가진 불포화 화합물로 제조나 저장 시 열과 빛에 의해 쉽게 파괴되어 활성이 감소하기 때문에, astaxanthin을 추출하기 전의 *H. pluvialis*와

추출 후의 astaxanthin은 빛에 노출 되지 않도록 하면서 -20 °C에서 냉동 보관하였다.

Acetone은 Oriental Chemical Industries Co. Ltd. (Korea)의 제품으로 순도 99.0% 이상을, methanol, ethanol, acetonitrile, ethylacetate, dichloromethane은 Burdick & Jackson (USA)의 제품으로 모두 HPLC급을 사용하였다. 그 외 모든 시약은 분석시약 급의 제품을 사용하였다.

2-2. 실험방법

2-2-1. *H. pluvialis*로부터의 astaxanthin 추출

빛에 노출 되지 않도록 하면서 -20 °C에서 냉동 보관한 *H. pluvialis* 균체 분말 40 mg을 막자사발에 넣고 막자로 1분간 최대한 고르게 분쇄하였다. 분쇄가 끝나면 추출에 사용하는 용매 3 mL를 첨가하여 분쇄하였다. 그런 후 10,000 g에서 5분간 원심분리하였다. 원심 분리 후 상등액을 따로 분리하여 알루미늄 호일로 잘 감싼 후 보관하였다. 상등액을 분리한 뒤 바닥에 남아있는 *H. pluvialis* 침전물에 다시 용매를 첨가하여 추출하는 과정을 *H. pluvialis* 세포의 탈색이 완전히 이루어질 때까지 반복하여 진행하였다[17].

2-2-2. 추출횟수에 따른 추출 효율 비교

빛에 노출 되지 않도록 하면서 -20 °C에서 냉동 보관한 *H. pluvialis* 균체 분말 40 mg을 막자사발에 넣고 막자로 1분간 최대한 고르게 분쇄하였다. 분쇄가 끝나면 acetone 3 mL를 첨가하여 2차 분쇄를 진행한 후 10,000 g에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 1차 추출 상등액을 따로 분리하여 보관하였다. 상등액을 분리한 뒤 바닥에 남아있는 *H. pluvialis* 침전물에 다시 용매를 첨가하여 추출하는 과정을 반복하여 진행하면서 2-7차 추출 상등액을 분리하여 보관하고, 8-10차 추출 상등액을 역시 따로 보관하였다. 추출한 상등액은 알루미늄 호일로 잘 감싼 후 보관하였다.

2-2-3. 분광학적 astaxanthin 분석

UV-VIS Spectrophotometer (Biomate 3S, Thermo scientific, USA)를 이용하여 실온에서 480 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 추출된 astaxanthin의 양을 분석하였다[17].

2-2-4. Acetone으로 추출한 추출액의 HPLC 분석

추출된 astaxanthin은 high-performance liquid chromatograph (HPLC)를 이용하여 분석방법을 각각 사용하였다[5,18].

HPLC는 Agilent사의 1260 Infinity LC System (Agilent Technologies Inc., USA)에 Waters Symmetry C₁₈ column (4.6 × 250 mm, 5 μm, Waters, USA)을 이용하여 검출기는 UV/visible 검출기(474 nm)를 사용하였다. Column 온도는 4 °C로 유지하였다. 유속은 1 mL/min, 이동상은 용매 A (methanol:tert-butyl methyl ether:1% (w/v) phosphoric acid, 81:15:4, v/v), 용매 B (methanol:tert-butyl methyl ether:1% (w/v) phosphoric acid, 16:80:4, v/v)를 사용하였다. Free astaxanthin과 ester-형태의 astaxanthin을 동시 분리하기 위하여, 각각의 이동상 용매는 0~15분까지 용매 A를 100%로 한 후, 23분까지 용매 B를 시간에 따라 0~100% 선형 농도 구배를 하여 점차적으로 증가시켰고, 그 후 4분 동안 용매 B의 비율을 100%로 유지한 다음 8분 동안 용매 A의 비율을 100%로 유지하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. Astaxanthin의 추출에 미치는 용매의 영향

*Haematococcus pluvialis*로부터 astaxanthin을 효율적으로 추출하기 위해서는 *H. pluvialis*의 세포벽을 파쇄하는 방법이 중요하다. 세포벽 파쇄를 위해 막자와 막자사발, 균질기, 초음파, 마이크로파, 효소 등을 사용하여 분쇄하는 방법들이 알려져 있는데[16,19,20], 고온 고압의 환경과 높은 에너지를 필요로 하는 장치나 고가의 효소를 사용하는 방법 대신 막자와 막자사발을 이용하여도 *H. pluvialis* 세포내에 축적된 astaxanthin을 간편하면서도 효율적으로 용매로 추출할 수 있어서 본 연구에서는 막자사발에 *H. pluvialis* 바이오매스 분말을 넣고 막자로 분쇄하였다.

물에는 난용성 물질인 astaxanthin을 *H. pluvialis*로부터 효율적으로 추출하기 위한 용매 선정을 위하여 acetonitrile, acetone, methanol, dichloromethane : methanol (1:3, v/v), ethylacetate : ethanol (1:1, v/v)을 사용하여 비교하였다. Dichloromethane : methanol (1:3, v/v)은 가장 널리 이용되는 추출 용매이고, acetonitrile과 acetone은 추출 효율이 높다고 알려진 용매이며, 그리고 ethylacetate : ethanol (1:1, v/v)은 기존에 사용되는 유기용매들의 독성영향을 줄이기 위해 사용되는 친환경적인 용매여서 선정하여 비교하였다. *H. pluvialis* 균체 분말을 막자사발에 넣고 막자로 1분간 최대한 고르게 분쇄한 후 추출용매를 첨가하여 추가로 분쇄하였을 때, 세포에 축적된 astaxanthin이 용매로 추출되었다.

Acetone을 추출용매로 사용하여 *H. pluvialis*로부터 astaxanthin을 추출할 때 추출 횟수에 따라 astaxanthin이 용매로 추출된 변화를 Fig. 1(a)와 (b)가 보여준다. *H. pluvialis*로부터 acetone으로 1회 추출하더라도 많은 양의 astaxanthin이 용매로 추출되며, 용매로 7회

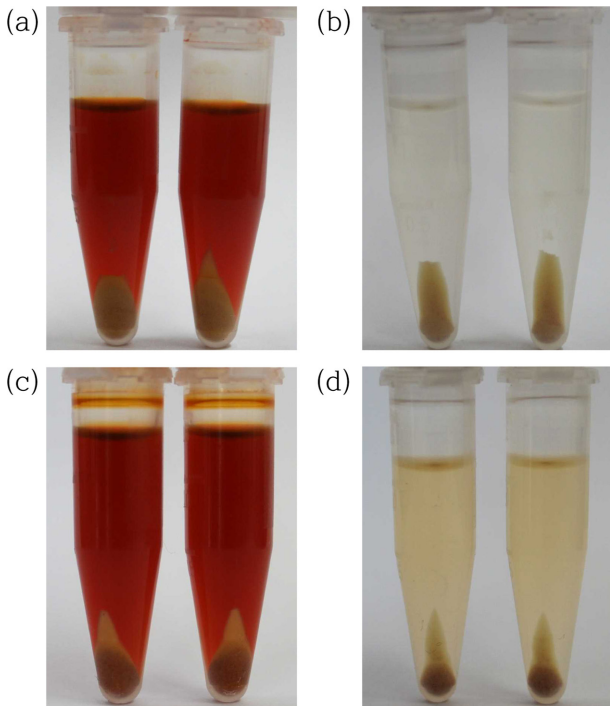


Fig. 1. Images of extracts from *H. pluvialis* (a) after 1st extraction, (b) after 7th extraction with acetone and (c) after 1st extraction, (d) after 7th extraction with ethylacetate : ethanol (1:1, v/v), respectively.

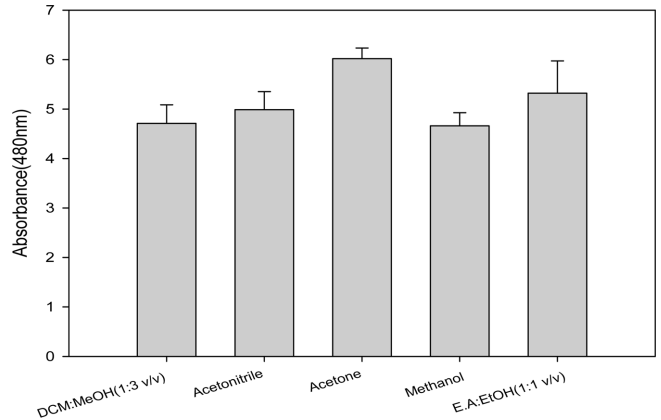


Fig. 2. Effect of solvents on the astaxanthin extraction from *H. pluvialis* (DCM : dichloromethane, MeOH : methanol, EA : ethylacetate, EtOH : ethanol).

추출한 후의 *H. pluvialis* debris는 1회 추출한 후의 *H. pluvialis* debris에 비해 탈색이 완전히 이루어진 것으로 확인할 수 있듯이, 7회 추출하면 *H. pluvialis*에 있는 astaxanthin이 대부분 추출되었다. Ethylacetate : ethanol (1:1, v/v)을 추출용매로 사용하였을 때에도 유사한 결과가 나오는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 1(c)와 (d)), 그 외 다른 용매들을 사용하였을 경우에도 최대 7회까지 추출을 하면 원심분리 후 *H. pluvialis* 침전물에서 더 이상 붉은색이 보이지 않고 탈색된 것으로 astaxanthin이 거의 존재하지 않음을 확인할 수 있었다.

*H. pluvialis*로부터 위의 다섯 가지 용매들을 각각 이용하여 7회까지 추출한 후 각 용매로 추출된 astaxanthin의 양을 spectrophotometer를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다. Fig. 2에 보인 바와 같이 acetone을 이용할 경우 다른 dichloromethane : methanol (1:3 v/v), acetonitrile, methanol, ethylacetate : ethanol (1:1, v/v) 용매에 비해 흡광도가 1.13~1.29 배 더 높았는데, 이는 acetone을 이용하였을 때 astaxanthin을 1.13~1.29 배 더 높은 효율로 추출할 수 있음을 보여주는 것이므로, 향후 실험에서는 acetone을 추출용매로 선정하여 사용하였다.

3-2. 추출횟수에 따른 추출 효율 비교

*H. pluvialis*로부터의 astaxanthin을 가장 효율적으로 추출할 수 있는 용매로 선정된 acetone을 이용한 적절한 추출 횟수를 선정하기 위하여 1차 추출 상등액, 2-7차 추출 상등액, 8-10차 추출 상등액을 HPLC로 분석하여 astaxanthin 추출량을 비교하였다(Fig. 3).

*H. pluvialis*가 붉은색의 휴면 포낭 세포로 전환하며 2차 대사산물로 세포내에 축적하는 astaxanthin은 축적 특성상 ester-형태의 astaxanthin로 다량 축적할 뿐만 아니라 그 ester-형태의 astaxanthin도 여러 형태의 astaxanthin 이성질체와 다양한 지방산이 결합하여 형성되므로 그 종류도 다양하다[17,21]. Ester-형태의 astaxanthin과 free astaxanthin을 분리하기 위하여 HPLC에서 이동상 용매 A (methanol: *tert*-butyl methyl ether:1% (w/v) phosphoric acid, 81:15:4, v/v)와 용매 B (methanol:*tert*-butyl methyl ether:1% (w/v) phosphoric acid, 16:80:4, v/v)를 사용하여 농도 구배 시스템을 적용하였으며, acetone을 이용하여 *H. pluvialis*로부터 추출한 astaxanthin의 크로마토그램을 Fig. 3이 보여준다. Retention time이 9분에 나타나는

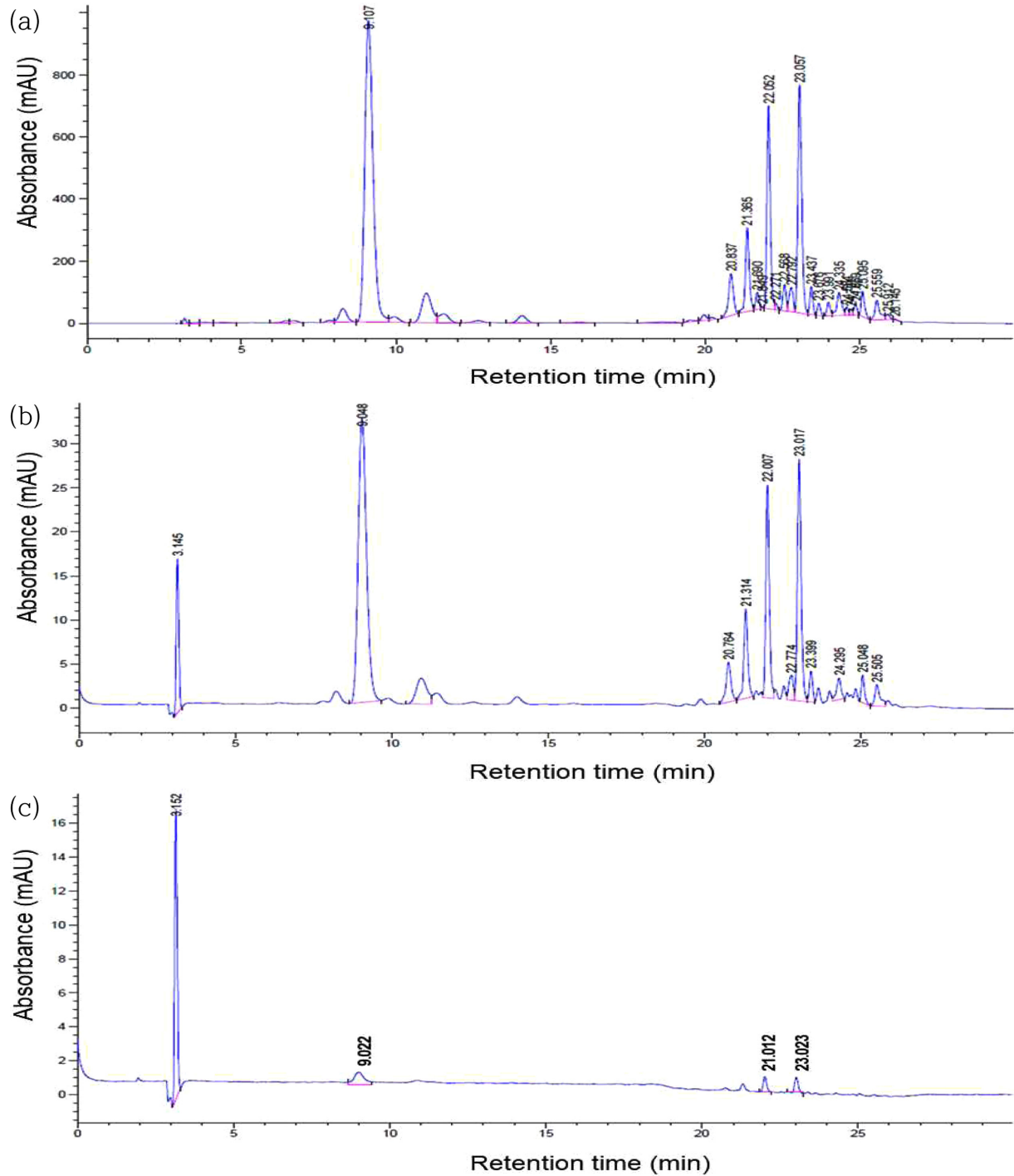


Fig. 3. HPLC chromatograms of extract from *H. pluvialis* (a) after 1st extraction, (b) after 2nd-7th extraction and (c) after 8th-10th extraction.

피크가 free astaxanthin이고, 20-26분 사이에 해당하는 피크들이 ester-형태의 astaxanthin 성분들이다[22]. Acetone으로 *H. pluvialis*로부터 astaxanthin을 추출할 경우, 10회에 걸쳐 추출하더라도 1차 추출 상등액에 *H. pluvialis*에 축적되어 있는 전체 astaxanthin의 96.7% 이상이 있을 정도로 acetone은 astaxanthin 추출효율이 높았다(Fig. 3). 이는 acetone을 이용하여 1회만 추출하더라도 *H. pluvialis*로부터의 astaxanthin 추출에 효과적임을 보여준다. 또한, *H. pluvialis*에 축적되어 있는 전체 astaxanthin 중 free astaxanthin은 45.9%이고, 나머지 54.1%는 ester-형태의 astaxanthin인데, 추출 횟수별 상등액에 존재

하는 free astaxanthin의 비율은 1차 추출 상등액에 45.9%이고, 2-7차 추출 상등액에는 45.8%, 8-10차 추출 상등액에는 56.7%이다.

*H. pluvialis*에 비해 astaxanthin을 소량 생산하는 효모 균주인 *Phaffia rhodozyma*는 대부분이 free astaxanthin으로 축적하는 반면 *H. pluvialis*에는 54.1%가 ester-형태의 astaxanthin을 축적하고 있다. 추출한 ester-형태의 astaxanthin들은 cholesterol esterase와 같은 효소 처리나 methanol에 용해한 NaOH와 같은 염기성 용매를 이용해 에스터 결합을 제거하는 가수분해 처리를 통해 free astaxanthin 형태로 전환할 수 있다[22-24].

4. 결 론

상당한 두께의 견고한 세포벽을 가지고 있는 astaxanthin 생산균 주인 *Haematococcus pluvialis*로부터 고온 고압의 환경과 높은 에너지를 필요로 하는 장치 없이 세포벽을 파쇄하여 astaxanthin을 손쉽게 효율적으로 추출하는 방법을 시도하였다. 막자와 막자사발을 이용하여 분쇄하여도 *H. pluvialis* 세포내에 축적된 astaxanthin을 간편하면서도 효율적으로 용매로 추출할 수 있었다. 본 연구에서 acetonitrile, acetone, methanol, dichloromethane : methanol (1:3, v/v), ethylacetate : ethanol (1:1, v/v)을 추출용매로 사용하여 비교하였을 때, acetone을 이용하였을 때 astaxanthin을 1.13~1.29 배 더 높은 효율로 추출할 수 있었다. *H. pluvialis*가 세포내에 축적하는 astaxanthin은 축적 특성상 ester-형태의 astaxanthin로 다량 축적하므로, 추출물내의 다양한 형태의 astaxanthin을 분리하기 위하여 이동상 용매 A (methanol:tert-butyl methyl ether:1% (w/v) phosphoric acid, 81:15:4, v/v)와 용매 B (methanol:tert-butyl methyl ether:1% (w/v) phosphoric acid, 16:80:4, v/v)를 사용하여 농도 구배 시스템을 적용한 HPLC 분석을 수행하였다. *H. pluvialis*에 축적되어 있는 전체 astaxanthin 중 free astaxanthin이 45.9%이고, 나머지 54.1%는 ester-형태의 astaxanthin이었으며, acetone으로 *H. pluvialis*로부터 추출할 경우, 1차 추출물에 *H. pluvialis*에 축적되어 있는 전체 astaxanthin의 96.7% 이상이 있을 정도로 acetone은 astaxanthin 추출효율이 높았다. 이상의 결과는 막자와 막자사발을 이용하여 분쇄한 후 acetone을 추출용매로 사용하면 *H. pluvialis* 세포내에 축적된 astaxanthin을 간편하면서도 효율적으로 추출할 수 있는 공정임을 보여준다.

감 사

이 논문은 2017년도 한남대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구가 수행되었습니다.

References

- Hong, S. P., Kim, M. H. and Hwang, J. K., "Biological Functions and Production Technology of Carotenoids," *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 1297-1306(1998).
- Guerin, M., Huntley, M. E. and Olaizola, M., "Haematococcus Astaxanthin; Applications for Human Health and Nutrition," *Trends Biotechnol.*, **21**(5), 210-216(2003).
- Mann, V., Harker, M., Pecker, I. and Hirschberg, J., "Metabolic Engineering of Astaxanthin Production in Tobacco Flowers," *Nature Biotechnol.*, **18**, 888-892(2000).
- Han, D., Li, Y. and Hu, Q., "Astaxanthin in Microalgae: Pathways, Functions and Biotechnological Implications," *Algae*, **28**, 131-147(2013).
- Chumpolkulwong, N., Kakizono, T., Ishii, H., and Nishio, N., "Increased Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* Mutants Isolated as Resistant to Diphenylamine," *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 429-434(1997).
- Chumpolkulwong, N., Kakizono, T., Ishii, H., and Nishio, N., "Enzymatic Conversion of Beta-carotene to Astaxanthin by Cell-extracts of a Green Alga *Haematococcus pluvialis*," *Biotechnol. Lett.*, **19**, 443-446(1997).
- Lim, G. B., Lee, S. Y., Lee, E. K., Haam, S. J. and Kim, W. S., "Separation of Astaxanthin from Red Yeast *Phaffia rhodozyma* by Supercritical Carbon Dioxide Extraction," *J. Biochem. Eng.*, **11**, 181-187(2002).
- Lorenz, R. T. and Cysewski, G. R., "Commercial Potential for *Haematococcus* microalgae as a Natural Source of Astaxanthin," *Trends Biotechnol.*, **18**, 160-167(2000).
- Schroeder, W. A. and Johnson, E. A., "Antioxidant Role of Carotenoids in *Phaffia Rhodozyma*," *J. Gen. Microbiol.*, **39**, 907-912 (1993).
- Kim, S., Cho, E., Yoo, J., In, M. -J. and Chae, H. J., "Extraction and Analysis of Astaxanthin from *Haematococcus*," *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **37**, 1363-1368(2008).
- Hagen, C., Siegmund, S. and Braune, W., "Ultrastructural and Chemical Changes in the Cell Wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during Aplanospore Formation," *Eur. J. Phycol.*, **37**, 217-226(2002).
- Margalith, P. Z., "Production of Ketocarotenoids by Microalgae," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 431-438(1999).
- Boussiba, S., "Carotenogenesis in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular Physiology and Stress Response," *Physiol. Plant*, **108**, 111-117(2000).
- Fabregas, J., Dominguez, A., Maseda, A. and Otero, A., "Interactions Between Irradiance and Nutrient Availability During Astaxanthin Accumulation and Degradation in *Haematococcus pluvialis*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **61**, 545-551(2003).
- Sarada, R., Tripathi, U. and Ravishankar, G. A., "Influence of Stress on Astaxanthin Production in *Haematococcus pluvialis* Grown under Different Culture Conditions," *Process Biochem.*, **37**, 623-627(2002).
- Kim, D. Y., Vijayan, D., Praveenkumar, R., Han, J. -I., Lee, K., Park, J. Y., Chang, W.S., Lee, J. -S. and Oh, Y. -K., "Cell-wall Disruption and Lipid/astaxanthin Extraction from Microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*," *Bioresour. Technol.*, **199**, 300-310(2016).
- Wellburn, A. R., "The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution," *J. Plant Physiol.*, **144**, 307-313(1994).
- Yuan, J. P. and Chen, F., "Chromatographic Separation and Purification of trans-Astaxanthin from the Extracts of *Haematococcus pluvialis*," *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3371-3375(1998).
- Jo, J., Shin, S., Jung, H., Min, B., Kim, S. and Kim, J., "Process Development for Production of Antioxidants from Lipid Extracted Microalgae Using Ultrasonic-assisted Extraction," *Korean Chem. Eng. Res.*, **55**, 542-547(2017).
- Kim, J. and Ha, S. H., "Hydrothermal Pretreatment of *Ulva pertusa* Kjellman Using Microwave Irradiation for Enhanced Enzymatic Hydrolysis," *Korean Chem. Eng. Res.*, **53**, 570-575(2015).
- Johnson, E. A. and An, G. H., "Astaxanthin from Microbial Sources," *Crit. Rev. Biotechnol.*, **11**, 297-326(1991).
- Yuan, J. P. and Chen, F., "Purification of trans-Astaxanthin from a High-yielding Astaxanthin Ester-producing Strain of the Microalga *Haematococcus pluvialis*," *Food Chem.*, **68**, 443-448(2000).
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A. and Abalde, J., "Analysis and Enhancement of Astaxanthin Accumulation in *Haematococcus pluvialis*," *Bioresour. Technol.*, **96**, 373-378(2005).
- Kim, Z. H., Kim, S. H., Lee, H. S. and Lee, C. G., "Enhanced Production of Astaxanthin by Flashing Light Using *Haematococcus pluvialis*," *Enzyme Microb. Technol.*, **39**, 414-419(2006).